

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Nutrición, Bromatología, Higiene y Seguridad
Alimentaria



TESIS DOCTORAL

**Efectos del consumo de matrices cárnicas modificadas sobre
marcadores del metabolismo lipídico y oxidación hepática**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Jorge Arturo Santos López

Directores

Juana Benedí González
Francisco José Sánchez Muniz
Mirandeli Bautista Ávila

Madrid, 2018



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

FARMACOLOGÍA | NUTRICION Y BROMATOLOGÍA I (NUTRICIÓN)

**EFFECTOS DEL CONSUMO DE MATRICES CÁRNICAS
MODIFICADAS SOBRE MARCADORES DEL
METABOLISMO LIPÍDICO Y OXIDACIÓN HEPÁTICA**

TESIS DOCTORAL

JORGE ARTURO SANTOS LÓPEZ

DIRECTORES

DRA. JUANA BENEDÍ GONZÁLEZ

DR. FRANCISCO JOSÉ SÁNCHEZ MUNIZ

DRA. MIRANDELI BAUTISTA ÁVILA

MADRID, 2017



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

FARMACOLOGÍA | NUTRICION Y BROMATOLOGÍA I (NUTRICIÓN)

**EFFECTOS DEL CONSUMO DE MATRICES CÁRNICAS
MODIFICADAS SOBRE MARCADORES DEL
METABOLISMO LIPÍDICO Y OXIDACIÓN HEPÁTICA**

TESIS DOCTORAL

JORGE ARTURO SANTOS LÓPEZ

MADRID, 2017



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

FARMACOLOGÍA | NUTRICION Y BROMATOLOGÍA I (NUTRICIÓN)

**EFFECTOS DEL CONSUMO DE MATRICES CÁRNICAS
MODIFICADAS SOBRE MARCADORES DEL METABOLISMO
LIPÍDICO Y OXIDACIÓN HEPÁTICA**

Memoria presentada por JORGE ARTURO SANTOS LÓPEZ para optar al grado de
Doctor por la Universidad Complutense de Madrid

VºBº. de la Directora

VºBº. del Director

VºBº. de la Directora

Dra. Juana Benedí González

Prof. Francisco José Sánchez Muniz

Dra. Mirandeli Bautista Ávila



UNIVERSIDAD
COMPLUTENSE
MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

La **Dra. Juana Benedí González**, Profesora Titular del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, el **Prof. Francisco José Sánchez Muniz**, Catedrático del Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y la **Dra. Mirandeli Bautista Ávila**, Profesora Titular del Área Académica de Farmacia del Instituto de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo,

C E R T I F I C A N

Que el presente trabajo de investigación titulado “Efectos del consumo de matrices cárnicas modificadas sobre marcadores del metabolismo lipídico y oxidación hepática” constituye la memoria presentada por el Licenciado Jorge Arturo Santos López para optar al grado de Doctor, y que ha sido realizada en los Departamentos de Farmacología y Nutrición y Bromatología I (Nutrición), ambos de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo nuestra dirección. Asimismo, en el marco del proceso de evaluación requerido, damos nuestro consentimiento para su presentación y defensa en la Universidad Complutense de Madrid.

Para que conste a los efectos oportunos, firmamos el presente certificado en Madrid a tres de abril de dos mil diecisiete.

Dra. Juana Benedí González Dr. Francisco José Sánchez Muniz Dra. Mirandeli Bautista Ávila

El trabajo de investigación que ha dado origen a esta memoria ha sido realizado en los Departamentos de Farmacología y de Nutrición y Bromatología I (Nutrición) de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, bajo el amparo de los proyectos AGL 2011-29644-C02-02 y AGL 2014-53207-C2-2-R del Ministerio de Economía y Competitividad.

Asimismo, el doctorando Jorge Arturo Santos López ha disfrutado de una beca del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México para estudios de Doctorado en el extranjero.

AGRADECIMIENTOS

Llegado este momento es preciso mencionar a los que de una forma u otra hicieron posible el camino que he recorrido. En primer lugar, que para mí son los más importantes, mi familia. Siempre he dicho que son el pilar que mantiene mi equilibrio. Somos un grupo en el que la esencia de uno es la esencia de todos. Cuando tienes alguien que te guíe, te cobije y te ejemplifique es cuando la incertidumbre se pulveriza, te deja atisbar el camino. Todo irá bien. Nunca puedes sentirte más auténtico y más consciente de estar viviendo cada momento. Cuando se vive no más, lo mejor posible, un poquito cada día, es como un viaje sin meta. Pero con ustedes he aprendido que para tener meta, lo que cuenta es el camino y su compañía. Y la mejor compañía somos nosotros juntos.

Un día, buscando horizontes nuevos emprendí el viaje que me trajo hasta aquí. Arriesgando lo seguro y sin darme cuenta comencé a vivir una de las aventuras más gratificantes de mi vida. La nostalgia se apoderaba con el recuerdo de cualquier rutina. El incómodo fenómeno de estar fuera de lo que se sabe y dentro de lo que se desconoce. Durante esta aventura el tiempo colocó a su ritmo personajes entrañables que, tan buenos como malos, me han ayudado a superar la lejanía de mi tierra y entender que el hogar se lleva y no se tiene.

De todos ellos he juntado piezas que me complementan. Los que me abrieron las puertas del este fascinante mundo al que ahora pertenezco, mis directores, y todos aquellos que sin serlo me han ayudado como tal. Entre rigor y risas me han contagiado su interminable pasión por la ciencia. Nunca el aprendizaje es poco, y menos suficiente. También, los que dentro y fuera de los muros académicos se han convertido en mi segunda familia. Ésos que han cultivado risas y penas. Somos un collage de culturas que a cualquiera enriquecen. Desde los que pensamos que algo *está padre*, los del *mola un montón*, y los que piensan en otra lengua.

El tiempo no pasa en vano, pero hay cosas que se hacen intemporales cuando su validez trasciende generaciones. A 400 años de haberse escrito, esta cita hoy me trae recuerdos de mi infancia y de mi familia; pero también refleja en gran parte las piezas que he colectado de todos a los que he conocido, porque después de todo uno nunca deja de enriquecer el espíritu, el carácter y el cuerpo.

CAPÍTULOS XLII - XLIII (Segunda Parte)

De los consejos que dio Don Quijote a Sancho Panza

Sancho, atento a este tu Catón, que quiere aconsejarte y ser norte y guía que te encamine y saque a seguro puerto de este mar proceloso donde vas a engolfarte; que los oficios y grandes cargos no son otra cosa sino un golfo profundo de confusiones. Esto que aquí te digo son documentos que han de adornar tu alma; y que han de servir para adorno del cuerpo.

Primeramente, has de temer a Dios, porque en el temerle está la sabiduría, y siendo sabio no podrás errar en nada.

Lo segundo, has de poner los ojos en quien eres, procurando conocerte a ti mismo, que es el más difícil conocimiento que puede imaginarse. Del conocerte saldrá el no hincharte como la rana que quiso igualarse con el buey.

Haz gala, Sancho, de la humildad de tu linaje, y no te desprecies de decir que vienes de labradores; porque viendo que no te corres, ninguno se pondrá a correrte; y préciate más de ser humilde virtuoso que pecador soberbio. Innumerables son aquellos que de baja estirpe nacidos, han subido a la suma dignidad.

Mira, Sancho: si tomas por medio a la virtud y te precias de hacer hechos virtuosos, no hay para qué tener envidia a los que los tienen príncipes y señores; porque la sangre se hereda, y la virtud se aquista, y la virtud vale por sí sola lo que la sangre no vale.

Hallen en ti más compasión las lágrimas del pobre, pero no más justicia, que las informaciones del rico. Procura descubrir la verdad por entre las promesas y dádivas del rico como por entre los sollozos e importunidades del pobre. Si acaso doblares la vara de la justicia, no sea con el peso de la dádiva, sino con el de la misericordia.

Anda despacio; habla con reposo; pero no de manera que parezca que te escuchas a ti mismo; que toda afectación es mala. Come poco y cena más poco; que la salud de todo el cuerpo se fragua en la oficina del estómago. Sé templado en el beber, considerando que el vino demasiado ni guarda secreto ni cumple palabra.

Si estos preceptos y estas reglas sigues, Sancho, serán luengos tus días, tu fama será eterna, tus premios colmados, tu felicidad indecible, vivirás en paz y beneplácito de las gentes, y en los últimos pasos de la vida te alcanzará el de la muerte, en vejez suave y madura.

Adaptado de: *Don Quijote de la Mancha* (Parte II, 1615). Miguel de Cervantes Saavedra.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Alimentos funcionales y nutrición	3
1.2 Carne como matriz en alimentos funcionales	6
1.2.1 Composición de la carne	7
1.2.2 Estrategias de producción de cárnicos funcionales	9
1.3 Ingredientes funcionales	11
1.3.1 Aceite de chía	11
1.3.1.1 Chía en la dieta	12
1.3.1.2 Composición del aceite de chía	12
1.3.1.3 Efectos sobre la salud del consumo de aceite de chía	14
1.3.2 Hidroxitirosol	16
1.3.2.1 Estructura y actividad farmacológica del hidroxitirosol	17
1.3.2.2 Hidroxitirosol como antioxidante	19
1.3.2.3 Hidroxitirosol en enfermedades cardiovasculares	21
1.3.2.4 Hidroxitirosol en Diabetes Mellitus	22
1.3.3 Silicio	23
1.3.3.1 Características generales del silicio	24
1.3.3.2 Silicio en la alimentación	25
1.3.3.3 Silicio en la salud	26
1.3.3.4 Silicio como antioxidante	27
1.4 Síndrome metabólico	28
1.4.1 Obesidad	29
1.4.2 Diabetes Mellitus	31
1.4.3 Resistencia a la insulina	33
1.4.4 Dislipemia	37
1.4.5 Factores que agravan el síndrome metabólico y riesgo cardiovascular	42
1.4.5.1 Envejecimiento y edad	43
1.4.5.2 Estrés oxidativo	43
1.4.5.2.1 Especies reactivas de oxígeno	44
1.4.5.2.2 Mecanismos celulares de defensa antioxidante	45
1.4.5.3 Metabolismo hepático	48
1.4.5.3.1 Hígado graso no alcohólico	53
II. INTERÉS DEL ESTUDIO	59
III. HIPÓTESIS DEL ESTUDIO	60
IV. OBJETIVOS	63
4.1 Objetivo general	63
4.2 Objetivos específicos	63
V. MATERIAL Y MÉTODOS	67
5.1 Materias primas	67
5.2 Preparación de emulsiones dobles W/O/W	67
5.3 Preparación de sistemas modelo cárnicos	68
5.4 Métodos analíticos <i>in vitro</i>	70
5.4.1 Morfología, estabilidad y tamaño de partícula de las emulsiones dobles	70
5.4.2 Capacidad antioxidante de emulsiones dobles y sistemas modelo cárnicos	70

5.4.2.1 Determinación de la actividad captadora de radicales libres mediante DPPH	70
5.4.2.2 Determinación de la capacidad reductora mediante ensayo FRAP	71
5.4.2.3 Cuantificación de la peroxidación lipídica	72
5.5 Estudio <i>in vivo</i>	72
5.5.1 Preparación de dietas experimentales conteniendo cárnicos enriquecidos	72
5.5.2 Diseño experimental y obtención de muestras	74
5.5.3 Métodos analíticos <i>in vivo</i>	75
5.5.3.1 Extracción de lípidos hepáticos	75
5.5.3.2 Determinación de parámetros plasmáticos	76
5.5.3.3 Determinación de marcadores de oxidación hepática	79
5.5.3.4 Detección y cuantificación de proteínas mediante Western-blot	81
5.5.3.5 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR)	82
5.5.3.6 Análisis histológico de hígado	83
5.6 Análisis estadístico	83
VI. RESULTADOS	87
6.1 Publicación 1	87
6.2 Publicación 2	97
6.3 Publicación 3	109
6.4 Publicación 4	127
6.5 Publicación 5	137
6.6 Publicación 6	149
6.7 Publicación 7	169
VII. DISCUSIÓN INTEGRADORA	187
7.1 Estabilidad y capacidad antioxidante de las emulsiones dobles	188
7.1.1 Características físicas de las emulsiones W/O/W	188
7.1.2 Capacidad antioxidante de las emulsiones W/O/W	190
7.2 Estabilidad y capacidad antioxidante de sistemas modelo cárnicos	194
7.2.1 Capacidad antioxidante de sistemas modelo cárnicos	195
7.3 Impacto del consumo de las dietas experimentales conteniendo cárnicos funcionales	198
7.3.1 Efecto del consumo de las dietas experimentales sobre la ingesta y el peso corporal	198
7.3.2 Efecto de la ingesta de las dietas experimentales sobre los mecanismos de defensa antioxidante	200
7.3.3 Efecto de la ingesta de las dietas experimentales sobre el metabolismo lipoproteico	204
7.3.4 Efecto de la ingesta de las dietas experimentales sobre la lipogénesis y oxidación de ácidos grasos en hígado	208
VIII. RESUMEN Y CONCLUSIONES	215
8.1 Conclusión general y futuras aplicaciones	217
IX. SUMMARY AND CONCLUSIONS	221
9.1 General conclusion and future application	223
X. BIBLIOGRAFÍA	227

ABREVIATURAS

5-LOX	5 lipoxigenasa
ACAT	Acil-CoA-colesterol-aciltransferasa
ACC	Acetil coenzima A carboxilasa
<i>Adipor2</i>	Receptor de leptina 2
AGL	Ácidos grasos libres
AGM	Ácidos grasos monoinsaturados
AGP	Ácidos grasos poliinsaturados
AGS	Ácidos grasos saturados
ALA	Ácido α -linolénico
AMPK	Proteína quinasa activada por AMP
Apo	Apolipoproteína
C	Dieta control
CAE	Código Alimentario Español
CAT	Catalasa
CHIA	Dieta hipercolesterolemiantes con cárnico enriquecido con aceite de chía
ChREBP	Proteína de unión al elemento de respuesta de carbohidratos
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CPT-1a	Carnitina palmitoiltransferasa 1a
DHA	Ácido docosahexaenoico
DMT1	Diabetes Mellitus tipo 1
DMT2	Diabetes Mellitus tipo 2
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazina
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EGIR	Grupo Europeo para el estudio de la resistencia a la insulina (<i>European Group for the Study of Insulin Resistance</i>)
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FASN	Ácido graso sintetasa
FDA	Food Drug Administration
FOSHU	Alimentos de uso específico para la salud (<i>Foods for specific health use</i>)
FRAP	Ensayo de la capacidad reductora de hierro (<i>Ferric reducing antioxidant power</i>)
FUFOSE	Comisión Europea sobre alimentos funcionales (<i>European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe</i>)
GPx	Glutathion peroxidasa
GR	Glutathion reductasa
GSH	Glutathion reducido
GSSG	Glutathion oxidado
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HC	Dieta hipercolesterolemiantes
HDL	Lipoproteína de alta densidad
HOMA-IR	Modelo de evaluación de la resistencia a la insulina
HxT	Hidroxitirosol; dieta hipercolesterolemiantes con cárnico enriquecido con hidroxitirosol
IDF	Federación internacional de Diabetes

IDL	Lipoproteína de densidad intermedia
IMC	Índice de masa corporal
<i>Insr</i>	Receptor de insulina
IR	Índice redox
LCAT	Lecitina-colesterol-aciltransferasa
LDL	Lipoproteína de baja densidad
<i>Ldlr</i>	Receptor de LDL
<i>Lepr OB-Rb</i>	Receptor de leptina OB-Rb
LPL	Lipoprotein lipasa
MB	Sistema modelo cárnico (<i>Meat batter</i>)
MDA	Malonildialdehído
NAFLD	Hígado graso no alcohólico
NAS	Evaluación de la actividad NAFLD
NASH	Esteatohepatitis no alcohólica
Nrf2	Factor nuclear similar a 2-(derivado de eritroide-2)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PGPR	Polirricinoleato de poliglicerol
PPAR α	Receptor activado por proliferador de peroxisoma alfa
PPAR γ	Receptor activado por proliferador de peroxisoma gamma
QM	Quilomicrón
qRT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	Especies reactivas de oxígeno
RP	Reestructurado cárnico
Si	silicio
SOD	Superóxido dismutasa
SREBP-1c	Proteína de unión al elemento regulador del estero1 1c
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TG	Triglicéridos
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad
$W_1/O/W_2$	Emulsiones dobles (<i>Water in Oil in Water</i>)

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1.1 Alimentos funcionales y nutrición

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la nutrición es la ingesta de alimentos en relación con las necesidades dietéticas del organismo. Mientras que una buena nutrición, definida como dieta suficiente y equilibrada combinada con actividad física frecuente es un índice de buena salud, una nutrición inadecuada puede afectar negativamente a la inmunidad, aumentar la vulnerabilidad a las enfermedades, alterar el desarrollo físico y mental y reducir la productividad [1].

En los últimos años, el concepto de *nutrición adecuada*, que cubre los requerimientos básicos del organismo y previene el desarrollo de enfermedades relacionadas con el déficit de nutrientes, ha dejado de ser un objetivo de salud en los países desarrollados. De esta manera surge el concepto de *nutrición óptima*, aquella que no solamente cubre las necesidades básicas, sino que mejora la calidad de la ingesta, en términos de nutrientes y no nutrientes, y que permite optimizar las funciones fisiológicas de cada individuo para asegurar el máximo de bienestar y salud a lo largo de toda su vida [2].

El constante interés en temas relacionados con el binomio alimento-salud, así como el desarrollo de nuevas tecnologías que hacen más fácil la obtención de nuevos productos alimentarios saludables y seguros dio paso a los denominados *Alimentos Funcionales* [3]. Este concepto se originó en Japón en los años 80. Fue en este país donde se estableció el término de *Alimentos de Uso Específico para la Salud* (FOSHU, por sus siglas en inglés de *Foods for Specific Health Use*). Los FOSHU se definen como: aquellos alimentos de los que se espera que ejerzan un efecto beneficioso específico sobre la salud, por adición de determinados constituyentes activos o por un efecto derivado de la supresión en los mismos (p.e. alérgenos alimentarios). Los efectos de tales adiciones o supresiones deben haber sido evaluados científicamente, y deberá solicitarse autorización para formular alegaciones relativas a los beneficios específicos que cabe esperar de su

INTRODUCCIÓN

consumo. Para ser considerado FOSHU, se requieren pruebas de que el producto alimenticio final, y no sus componentes individuales aislados, ejerza un efecto saludable sobre el organismo cuando se consume como parte de una dieta usual [4-6].

Los FOSHU deben cumplir además con tres características básicas, necesarias para poder clasificarlos como tal. Primero, que se trate de un alimento que contenga ingredientes de origen natural, y no de formas farmacéuticas procesadas; en segundo lugar, pueden ser consumidos como parte de la dieta diaria; y finalmente, que deben mejorar o regular un proceso biológico particular mediante el cual se prevenga o controle una enfermedad específica [7,8].

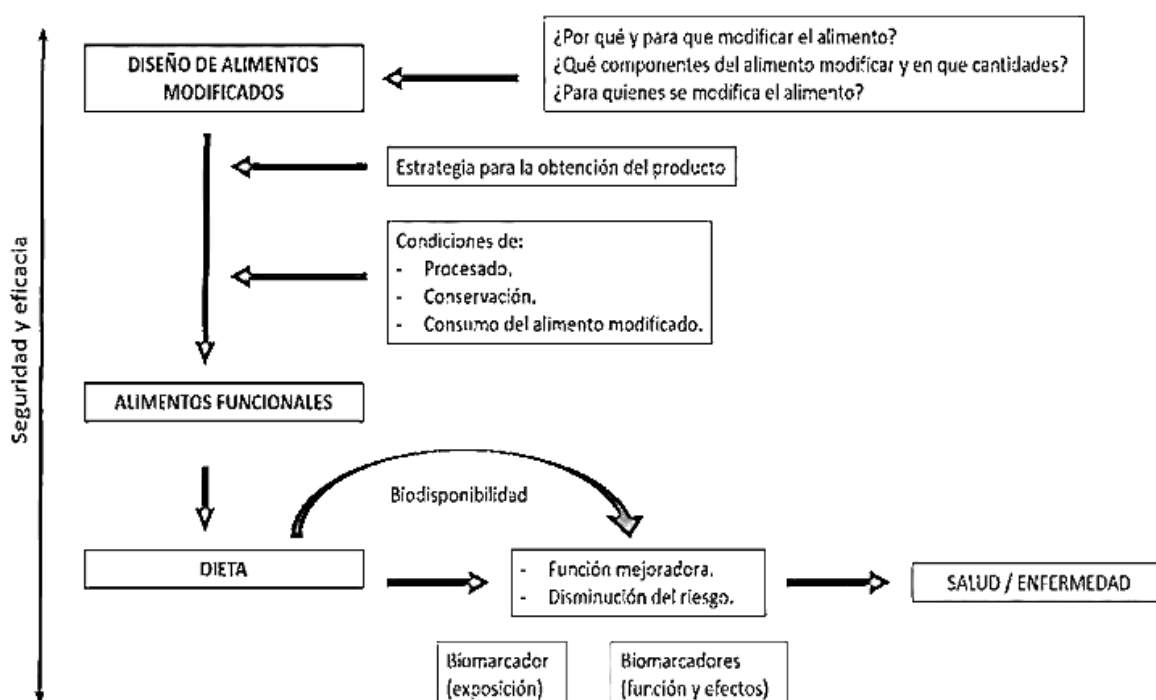


Figura 1. Consideraciones para el diseño, desarrollo y validación de alimentos funcionales. Adaptado González-Torres (2016).

A raíz de la información derivada fundamentalmente de los alimentos FOSHU, la Comisión Europea sobre alimentos funcionales elaboró un proyecto en 1998 denominado *Ciencia de los Alimentos Funcionales en Europa* (FUFOSE, *European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe*) [9] que definió este tipo de alimentos como: aquel que pueda demostrar satisfactoriamente que ejerce un efecto beneficioso sobre

INTRODUCCIÓN

una o más funciones selectivas del organismo, además de sus efectos nutritivos intrínsecos, de modo tal que resulte apropiado para mejorar el estado de salud y bienestar, reducir el riesgo de enfermedad, o ambas cosas. Establece también que deben seguir siendo alimentos y deben demostrar sus efectos en las cantidades normales en las que habitualmente se consume en la dieta. De esta definición también se deriva la norma que dicta sobre el efecto o beneficio que el alimento funcional produzca, el cual debe ser demostrado científicamente y además que este se produzca a niveles relevantes [9].

Un alimento funcional puede ser natural o transformado mediante procesos tecnológicos. En este proceso de modificación caben diversas posibilidades: 1. Eliminación/reducción de un componente con efectos fisiológicos negativos; 2. Aumento de la concentración de un componente presente hasta unos niveles que produzcan efectos beneficiosos (enriquecimiento); 3. Incorporación de algún componente adicional con potenciales efectos positivos (fortificación); 4. Sustitución parcial de un ingrediente con efectos fisiológicos potencialmente negativos por otro con efectos fisiológicos beneficiosos; 5. Aumento de la biodisponibilidad de uno o más componentes encaminados a producir efectos beneficiosos; 6. La combinación de cualquiera de estas posibilidades [7,8,10]. La **Figura 1** muestra un esquema general del diseño, desarrollo y validación de alimentos funcionales [7,11].

La evolución en el desarrollo de alimentos funcionales autorizados demuestra el auge de los mismos a través del tiempo. Así, en 1998 existían 126 alimentos autorizados, en julio de 2006 el número ascendía a 586, divididos en siete categorías [12]:

- Alimentos que regulan las condiciones gastrointestinales.
- Alimentos que ayudan a regular los niveles de colesterol.
- Alimentos que reducen los niveles de triglicéridos en sangre.
- Alimentos que ayudan a regular la presión arterial elevada.
- Alimentos que ayudan a regular los niveles elevados de glucosa en sangre.
- Alimentos que mejoran la absorción de minerales.
- Alimentos que mantienen la salud de dientes y huesos.

INTRODUCCIÓN

En el desarrollo de un alimento funcional, continuamente se presenta el reto de diseñar un producto que al ser comercializado tenga una buena aceptación. En muchos casos, el principal obstáculo es aquel relacionado con la elección de una matriz adecuada. Esta debe cumplir requisitos fundamentales como tener la capacidad de soportar la formulación y asegurar que el producto mantenga las cualidades hedónicas aceptables. Los alimentos que poseen matrices con mejor sabor, palatabilidad, estabilidad, o forman parte del consumo cotidiano tendrán la mayor posibilidad de aceptación por los consumidores [13].

Dado que al igual que los alimentos FOSHU, los alimentos funcionales deben ser alimentos y no formas farmacéuticas [14], la industria alimentaria viene trabajando desde hace décadas con diferentes matrices, que por un lado sean de *obligado consumo*, y en segundo lugar que no hagan inviable tecnológica o económicamente obtener el alimento funcional. Con ello la industria conseguiría que el consumidor acepte y consuma diariamente un alimento de características muy similares al original y que además no le suponga un reto tecnológico que encarezca el producto. Entre todas las matrices alimentarias, resaltan los lácteos, a los que se han incorporado multitud de componentes (productos de la soja, ácidos grasos omega-3, ácido conjugado del ácido linoleico, ácido fólico, esteroides de plantas, etc.) [15,16]. También las golosinas, los pescados o derivados de la pesca se utilizan como matrices para la obtención de alimentos funcionales [17].

Dadas las implicaciones de la carne y derivados cárnicos en el desarrollo y discusión de esta memoria de Tesis Doctoral, se tratará a continuación, en el apartado 1.2, de forma particular algunos aspectos relevantes que atañen a la carne y sus derivados.

1.2 Carne como matriz en alimentos funcionales

Dentro de los alimentos funcionales el sector cárnico es uno de los más desarrollados, debido quizás a que la industria de estos productos representa un papel importante en la economía, lo cual permite ser un vehículo adecuado para la introducción de productos modificados.

La carne y los derivados cárnicos constituyen un grupo de alimentos que contribuyen, de forma relevante, a la ingesta de diferentes nutrientes necesarios para cumplir los requisitos metabólicos del organismo. Los productos cárnicos son además elementos comunes en la dieta, altamente consumidos y de gran aceptación en sociedades desarrolladas [18]. Sin embargo, de forma intrínseca a su consumo, también contribuyen, cuando se ingieren en exceso, a incrementar el aporte de grasas saturadas, colesterol, y otras sustancias que pueden tener consecuencias negativas para la salud dependiendo de una variedad de factores y circunstancias fisiopatológicas [18-20]. Es por ello que dentro del sector cárnico se realizan continuamente esfuerzos para modificar su composición y poner a disposición del consumidor productos más saludables. Así, se han empleado estrategias genéticas y nutricionales se han empleado para reducir el nivel de grasa y colesterol, alterar el perfil de ácidos grasos, e incrementar la presencia de antioxidantes y minerales. Los avances en distintas áreas del conocimiento permiten descubrir nuevas posibilidades en el desarrollo de este tipo de productos [19,21,22].

1.2.1 Composición de la carne

La carne es un alimento con un alto contenido de agua (60-80%), proteínas de alto valor biológico (16-25%, de los cuales aproximadamente el 40% son aminoácidos esenciales como fenilalanina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, treonina, triptófano, y valina), y grasa (1-30%). También contiene diversos micronutrientes como hierro, zinc, selenio, sodio y potasio; vitaminas B₆, B₁₂, niacina, tiamina y retinol; así como ciertos ácidos grasos esenciales. La composición de la carne varía en función a la especie de procedencia, alimentación, edad, sexo y el tipo de corte [23-25]. La **Tabla 1** resume los componentes de los principales tipos de carne roja consumidos en España.

Según el Código Alimentario Español (CAE) la carne y sus derivados se clasifican en dos grupos. La carne fresca (parte comestible de los músculos de los bóvidos, óvidos, suidos, cápridos, équidos y camélidos sanos sacrificados en condiciones higiénicas) y la carne procesada o productos cárnicos (productos alimenticios preparados total o parcialmente con carne o despojos de especies autorizadas para tal fin) [26].

INTRODUCCIÓN

Tabla 1. Composición nutricional (por cada 100g) de carne de vacuno y cerdo

	VACUNO	CERDO
Energía (kcal)	131	155
Proteína (g)	20,7	20,0
Niacina (mg)	8,1	8,7
Tiamina (mg)	0,1	0,9
Vitamina B ₁₂ (µg)	2,0	3,0
Hierro (mg)	2,7	1,5
Zinc (mg)	3,8	2,5
Selenio (mg)	3,0	14,0
Sodio (mg)	61,0	76,0
Potasio (mg)	350,0	370,0
Grasa total (g)	5,4	8,3
AGS (g)		
C8:0	0,02	0,02
C14:0	0,12	0,07
C15:0	0,05	0,03
C16:0	0,94	1,2
C17:0	0,06	0,03
C18:0	0,53	0,6
AGM (g)		
C16:1	0,12	0,12
C18:1	1,23	1,8
C18:1n7	0,3	0,51
C20:1	0,01	0,05
AGP (g)		
C18:2n6	0,2	0,78
C18:3n3	0,01	0,06
C20:2n6	0,0	0,03
C20:4n6	0,01	0,03
Ácidos grasos <i>trans</i>	0,18	0,12
Colesterol (mg)	59	69

Adaptado de Delgado-Pando (2013) y Moreiras-Tuni y cols. (2008). AGS, ácidos grasos saturados; AGM, ácidos grasos monoinsaturados; AGP, ácidos grasos poliinsaturados.

1.2.2 Estrategias de producción de cárnicos funcionales

Las estrategias para obtener un alimento funcional derivado de matrices cárnicas se basan en limitar o inhibir los compuestos con efectos negativos para la salud, y aumentar o añadir aquellos con efectos beneficiosos. Los dos principales enfoques a partir de los cuales se obtienen estos alimentos son (**Figura 2**) [7,11]:

- Las que afectan a las prácticas de producción animal (genética y nutricional): Estas estrategias representan la primera oportunidad de modificar el cárnico *in vivo*. Existen diversos métodos para inducir cambios en la carne, basados en las diferencias que los tejidos presentan en función de la raza, sexo, condiciones ambientales y, principalmente, la alimentación (que puede o no incluir ingredientes activos). Los cambios que se pueden conseguir incluyen mejora en el perfil lipídico (contenido de grasa, composición de ácidos grasos, o niveles de colesterol), incremento de vitaminas y minerales, compuestos bioactivos, etcétera [21].
- Las que implican un sistema de transformación de la carne (proceso de reformulación): Existen una gran variedad de estrategias que se pueden utilizar para eliminar, reducir, aumentar, añadir y/o reemplazar diferentes componentes bioactivos de la carne. En los procesos de reformulación de productos cárnicos se pueden emplear ingredientes tradicionales e ingredientes diseñados específicamente con ciertos atributos que confieren propiedades biológicamente específicas [19].

En los últimos años, el interés en el desarrollo de productos cárnicos con un perfil lipídico mejorado ha ido creciendo. Existen diversos procedimientos para incorporar aceites “saludables” en productos cárnicos. De entre ellos, el basado en la formación de emulsiones O/W (pre-emulsiones) ha sido el más empleado. Dicha emulsión es preparada con antelación, adicionando el aceite como un ingrediente más en sustitución de la grasa animal habitualmente utilizada en la elaboración del producto. Presenta numerosas ventajas asociadas a la facilidad de integración en diversos derivados cárnicos y a la mejora de las propiedades ligantes de grasas del sistema, al estar el aceite estabilizado o inmovilizado en la matriz proteica. De este modo se reducen los fenómenos de

INTRODUCCIÓN

coalescencia y permanece estable en el producto a lo largo de su procesamiento, conservación y consumo. De igual modo constituye un excelente medio de aumentar la estabilidad oxidativa del aceite puesto que permite la incorporación simultánea de antioxidantes [27].

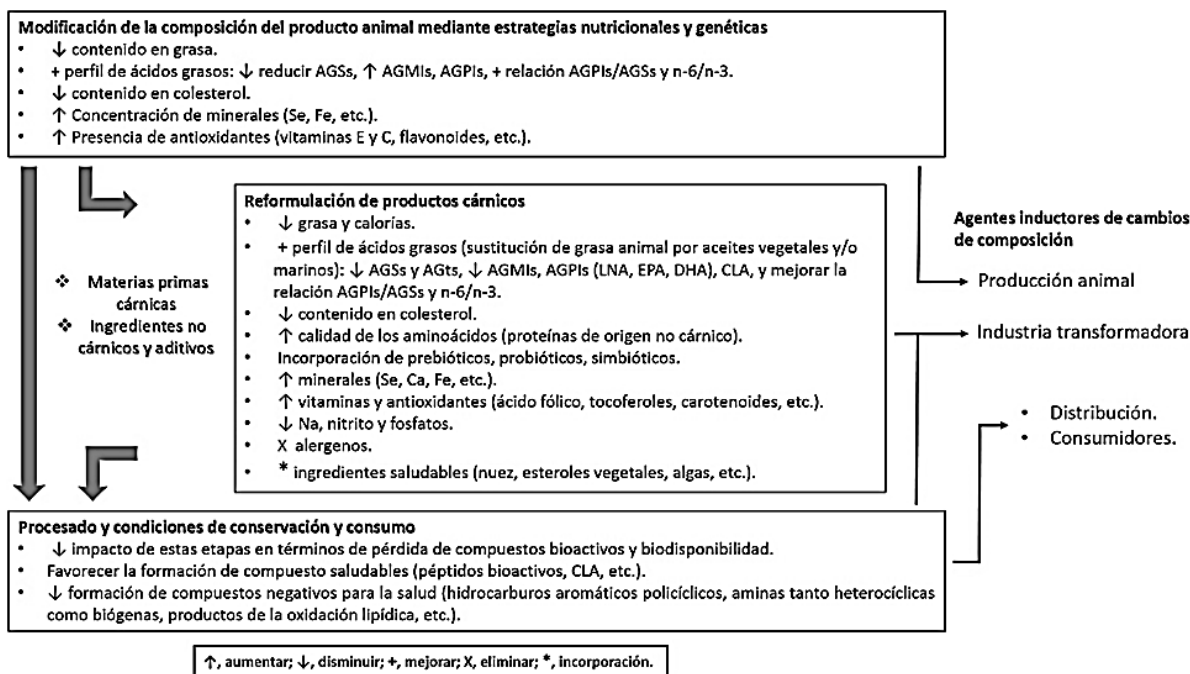


Figura 2. Estrategias de producción animal y reformulación de productos cárnicos para la obtención de cárnicos funcionales. Adaptado de González-Torres (2016).

En este marco, la utilización de emulsiones múltiples supone una novedosa estrategia de incorporación de aceites en productos cárnicos. Las emulsiones múltiples *Water-in-Oil-in-Water* ($W_1/O/W_2$) o emulsiones dobles son sistemas en los cuales pequeñas partículas de agua (W_1) se encuentran dispersas dentro de glóbulos de grasa (O), que a su vez se encuentran dispersos en una segunda fase acuosa (W_2). Debido a la capacidad de mantener sustancias encapsuladas, tanto en la fase interna como en la fase intermedia, y liberarlas de manera gradual al medio, las dobles emulsiones tienen extensas aplicaciones en la industria farmacéutica, cosmética y otras. En alimentos proporcionan ventajas como mejora de las propiedades sensoriales, mejora del sabor y liberación controlada de ingredientes inestables [28,29]. El hecho de estar constituidas por fases acuosa y oleosa proporciona la ventaja de poder incorporar compuestos

liposolubles e hidrosolubles (p.e. hidroxitirosol), y además la fracción oleosa puede variar y ser elegida en función a las características que se le quiera dar al producto final. Por lo tanto, las emulsiones múltiples constituyen una herramienta a considerar en el diseño y desarrollo de alimentos funcionales, especialmente cuando se requiere de mecanismos de protección de ingredientes y mejora del perfil lipídico [29].

1.3 Ingredientes funcionales

El desarrollo de los alimentos funcionales se ha orientado principalmente hacia aquellos cuya formulación contiene productos de origen natural tales como aceites con mejor perfil de ácidos grasos, vitaminas, minerales, antioxidantes, etc. En este contexto, como parte del proyecto del cual se deriva la presente Memoria de Tesis Doctoral, se evaluó el efecto *in vivo* del consumo de productos cárnicos enriquecidos con aceite de chía, hidroxitirosol o silicio.

1.3.1 Aceite de chía

Chía es el nombre común para algunas especies de *Salvia*, entre los cuales *Salvia hispánica* L. es una de las más importantes. *S. hispánica* L. lleva el nombre en honor de Carlos Linneo (1707-1778) quien la encontró en el nuevo mundo y la confundió con una planta nativa de España [30]. Sin embargo, la chía es nativa de México y fue introducida en España después de que Hernán Cortés se estableciera en México [31].

Los usos culinarios de la semilla de chía han sido ampliamente descritos, principalmente por la obtención de harinas, concentrados de mucílago y aceite. Varios autores han destacado la importancia del uso de la chía como ingrediente en bebidas y alimentos en el México precolombino. Existen diversas hipótesis acerca de la importancia que la chía tenía para los habitantes precolombinos de Mesoamérica, en algunos trabajos se describe el uso de las semillas en la medicina popular y la preparación de alimentos, así como en cuestiones artísticas y religiosas [32].

1.3.1.1 Chía en la dieta

La chía puede ser considerada como un alimento funcional dado que, además de contribuir a mejorar el perfil nutricional básico, tiene efectos en la prevención de ECV, trastornos inflamatorios y del sistema nervioso, DMT2, entre otros. En la actualidad, las semillas de chía ofrecen además un enorme potencial a nivel industrial para la fabricación de productos farmacéuticos y nutracéuticos, así como su incorporación (total o de alguno de sus componentes) en diversas formulaciones de alimentos [33].

Desde el año 2000, el Departamento de Salud de EEUU, a través de las Directrices Dietéticas (*US Dietary Guidelines*) recomienda el uso de la semilla de chía, en cantidades que no excedan 48 g/día, como alimento primario [34]. La Comisión Europea aprobó el uso de semillas de chía como ingrediente extra en los productos de panificación con un límite no superior al 5%. Además de pan, la industria alimentaria de varios países de todo el mundo, incluyendo EEUU, Canadá, Chile, Australia, Nueva Zelanda y México, ha utilizado ampliamente la semilla de chía o su aceite para diferentes aplicaciones como cereales para el desayuno, adición a zumos de frutas, etc. [35].

Como ingrediente funcional, las semillas o el aceite de chía se han utilizado, principalmente con el objetivo de optimizar el perfil lipídico de los alimentos, mejorar la respuesta inflamatoria, favorecer la absorción de nutrientes, y en la prevención de enfermedades cardiovasculares [36-40].

1.3.1.2 Composición del aceite de chía

Aunque debido a su composición las hojas de las plantas de chía tienen un interés comercial elevado, las semillas son la parte más importante. Esto radica en la alta cantidad de componentes bioactivos que poseen, fundamentalmente proteínas, fibra, antioxidantes y aceite con alto contenido en ácidos grasos poliinsaturados (AGP) [41,42]. La composición de la semilla es variable y depende de la región donde se cultive [43]. A pesar de que la planta crece mejor en regiones tropicales y subtropicales, las plantas de chía también pueden ser cultivadas en climas templados [44,45].

INTRODUCCIÓN

Las semillas obtenidas en un clima endémico tienen una composición media de un 6% de humedad, 17% de proteína, 31% de lípidos totales, 35% de fibra dietética total, 42% de hidratos de carbono totales y 335-860 mg/100 g de calcio, fósforo, potasio y magnesio; y en menor medida sodio, hierro y zinc (4-16 mg/100 g). Además, la semilla de chía es una buena fuente de niacina y vitaminas A y C [46].

La semilla de chía tiene 2, 3, 8, y 9 veces más fibra por cada 100 g de porción comestible que el trigo, la avena, el maíz y el arroz, respectivamente. El agua y los extractos metanólicos de la semilla contienen una cantidad significativa de compuestos fenólicos como miricetina, quercetina y kaempferol [47].

El perfil lipídico del aceite extraído de las semillas de chía ha sido ampliamente documentado en la literatura. Notablemente, la semilla contiene cantidades significativas de ácido graso α -linolénico (ALA), e independientemente del origen de la semilla la cantidad de ALA representa el 75% de su peso. Otras fuentes naturales que contienen cantidades similares de ácidos grasos son los aceites de cártamo y girasol con 75% y 67%, respectivamente. Sin embargo, estos aceites no contienen ALA. El aceite de colza también proporciona un alto contenido de ácidos grasos insaturados (67%), debido fundamentalmente a la presencia de ácido oleico [47]. De acuerdo con las tablas de composición del Departamento de Agricultura de EEUU [46] y Ayerza [43], los ácidos grasos presentes en el aceite de chía varían en función de la región donde se cultive la planta. Las semillas de chía representan la fuente vegetal con más alta concentración de omega-3. Poseen un 33% de aceite, del cual el ALA representa el 62% y el linoleico el 20%. La chía es el cultivo con mayor porcentaje de ácidos grasos esenciales (AGE) al tener el 82% de sus lípidos con dicha característica. El aceite extraído contiene por término medio un 5% de ácidos grasos saturados (AGS), 15% de monoinsaturados (AGM) y 80% de poliinsaturados (AGP). Entre los AGS, la relación ácido palmítico/ácido esteárico es de 2:1, mientras que para los AGM la relación ácido oleico/ácido palmitoleico es de 5:1. Destaca entre los AGP la relación omega-6/omega-3, y en particular la relación ácido linoleico/ALA que es de 1:3.

1.3.1.3 Efectos sobre la salud del consumo de aceite de chía

Existe un interés renovado en el uso de chía como una excelente fuente de ácidos grasos omega-3 y fibra dietética. Los AGP de la familia omega-6 y omega-3, son compuestos de suma importancia para la nutrición humana, nutrientes esenciales que deben adquirirse por fuente exógena. Las cantidades necesarias de ácidos grasos omega-3 van a depender del ciclo de vida de cada persona y de su estado fisiológico o patológico, que pueden llevar a un aumento en las necesidades de ácidos grasos. Se estima en promedio que es necesaria una ingesta del 1% de la energía total de ácidos grasos omega-3 y un 4% de la energía total para los omega-6. El problema radica en que el contenido de ácidos grasos omega-3 en nuestra alimentación es muy bajo, por lo que el consumo diario no alcanza a superar el 0,5 % de la energía total.

Los ácidos grasos madre de la familia omega-6 y omega-3 son respectivamente el ácido linoleico y el ALA, y de ellos derivan otros ácido grasos con mayor número átomos de carbono e insaturaciones como el ácido araquidónico (20:4 omega-6), ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 omega-3), y ácido docosahexaenoico (DHA, C22:6 omega-3). A su vez derivados de estos ácidos grasos con 20 y 22 átomo de carbono proceden compuestos como prostaglandinas, tromboxanos, prostaciclina, leucotrienos, resolvinas, etcétera, con multitud de acciones biológicas [48]. De todas las fuentes de ácidos grasos omega-3, sólo el lino y la chía tienen su origen en cultivos agrícolas, los cuales aportan cantidades del ácido graso madre ALA. Los ácidos grasos EPA y DHA son casi en su totalidad de origen marino. La incorporación de estos ácidos grasos del pescado ya preformados constituye una fuente muy biodisponible de ácidos grasos omega-3 de cadena muy larga. La evidencia sugiere que los ácidos grasos omega-3 juegan un rol importante en la membrana celular. La función de éstos ácidos grasos, es aportar mayor flexibilidad a las membranas celulares, permitiendo el movimiento de proteínas en su superficie y dentro de la bicapa lipídica [49].

INTRODUCCIÓN

Tabla 2. Principales estudios *in vivo* realizados con *Salvia hispánica L* como ingrediente funcional y sus beneficios en la salud

Parte del vegetal o extracto	Usos	Beneficio en la salud y ventajas tecnológicas	Referencias
Semilla entera	<ul style="list-style-type: none"> • Consumo directo. • Ingrediente en la fabricación de panes, galletas, cereales compuestos y demás derivados. • Ingrediente en la elaboración de zumos y bebidas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Ayuda en la mejora de la relación entre fibra soluble/insoluble. • Ayuda a reducir los niveles de colesterol y glucosa. Mejora la respuesta a la insulina y favorece la defensa antioxidante. • La fibra es un buen agente para formar geles, retener lípidos y dar textura a los alimentos. 	[17,41,50-55]
Aceite, proteína y fibra	<ul style="list-style-type: none"> • Aceite encapsulado como suplemento de ALA y esteroides. • Aceite extraído como alternativa a los aceites convencionales en la elaboración de alimentos. • Fracción proteica empleada como agente emulsificante, o como fuente de péptidos bioactivos. • Fuente de mucílagos y fibra soluble como suplemento o como agente emulsificante. 	<ul style="list-style-type: none"> • Mejora en los marcadores de daño cardiovascular. • La fibra soluble regula los niveles de colesterol y triglicéridos, y disminuye la respuesta inflamatoria. • Los péptidos bioactivos han demostrado ser buenos agentes protectores ante daño oxidativo. 	[56-64]
Compuestos antioxidantes	<ul style="list-style-type: none"> • Elaboración de productos nutraceuticos. • Como suplemento de polifenoles en la dieta. • Enriquecimiento de alimentos fácilmente oxidables. 	<ul style="list-style-type: none"> • Efecto protector ante estrés oxidativo, captación de radicales libres y ROS. • Mejora la defensa celular reforzando el sistema endógeno de antioxidantes. 	[33,65-67]

Adaptado de Valdivia-López y Tecante (2015).

Ulbricht y cols. [68] informaron, mediante una revisión de diversos estudios *in vivo* con chía, que esta planta tiene posibles efectos en el tratamiento de alergias, cáncer, enfermedades cardiovasculares, trastornos hormonales y endocrinos, hiperlipidemia, hipertensión, apoplejía y vasodilatación. Algunas pruebas también sugirieron posibles

efectos anticoagulantes, antioxidantes y antivirales. Los autores concluyen que la evidencia para apoyar la eficacia de *S. hispanica* para cualquier indicación mencionada es limitada. Hasta el momento, pocos estudios clínicos han examinado los efectos de *S. hispanica* sobre los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV).

Se ha demostrado que el consumo de 37 g/día de semilla de chía tiene un efecto positivo sobre los marcadores riesgo cardiovascular al reducir la presión arterial, ciertos marcadores inflamatorios y de coagulación en pacientes con DMT2. También se ha comprobado que la ingesta de dosis crecientes de chía atenúa la glucemia postprandial de manera dosis-dependiente [69,70]. El consumo de semilla de *S. hispanica* demostró la capacidad de disminuir los niveles plasmáticos de triglicéridos y aumentar el de HDL-colesterol y ácidos grasos omega-3 [71]. La **Tabla 2** resume los principales estudios realizados *in vivo* con semillas, aceite o componentes fenólicos extraídos de chía y usados como ingrediente funcional en distintos tipos de formulaciones y sus beneficios en la salud.

1.3.2 Hidroxitirosol

En ausencia de una adecuada protección antioxidante, los lípidos ricos en AGP son muy propensos a la auto-oxidación al quedar expuestos al oxígeno atmosférico, esto aunado a los procesos de cocción, almacenamiento y variaciones de temperatura, hace que se puedan generar compuestos secundarios dañinos para el organismo [72].

Los antioxidantes, tanto sintéticos como naturales, son una buena alternativa como medida de prevención ante la oxidación de los productos cárnicos a través del tiempo [73,74]. Además son una buena propuesta cuando se trata del diseño de alimentos funcionales por los beneficios adicionales al organismo.

Los polifenoles son ampliamente reconocidos como sustancias con actividad antioxidante y son, de manera natural, comunes en diversos alimentos de origen vegetal [75]. Dentro de este grupo de compuestos, el hidroxitirosol (HxT; 2-(3,4-dihidroxifenil)etanol) es uno de los más comunes y abundantes. Es componente principal

INTRODUCCIÓN

del aceite de oliva, y dado que España es un país con gran tradición de consumo de este aceite, el HxT es un compuesto ingerido diariamente en nuestra dieta habitual (**Figura 3**) [76,77]. No obstante, la utilización creciente de otros aceites culinarios o el consumo de aceites de oliva refinado supone la reducción importante del aporte de este antioxidante en la dieta actual española.

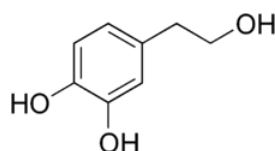


Figura 3. Estructura primaria de la molécula de hidroxitirosol

1.3.2.1 Estructura y actividad farmacológica del hidroxitirosol

El HxT es un metabolito que se encuentra principalmente como derivados secoiridoides, en forma de acetato, o en forma libre. El HxT y sus derivados provienen de la hidrólisis enzimática de la oleuropeína (éster de HxT y ácido elenólico) presente en las aceitunas durante la extracción del aceite de oliva (**Figura 4**) [78].

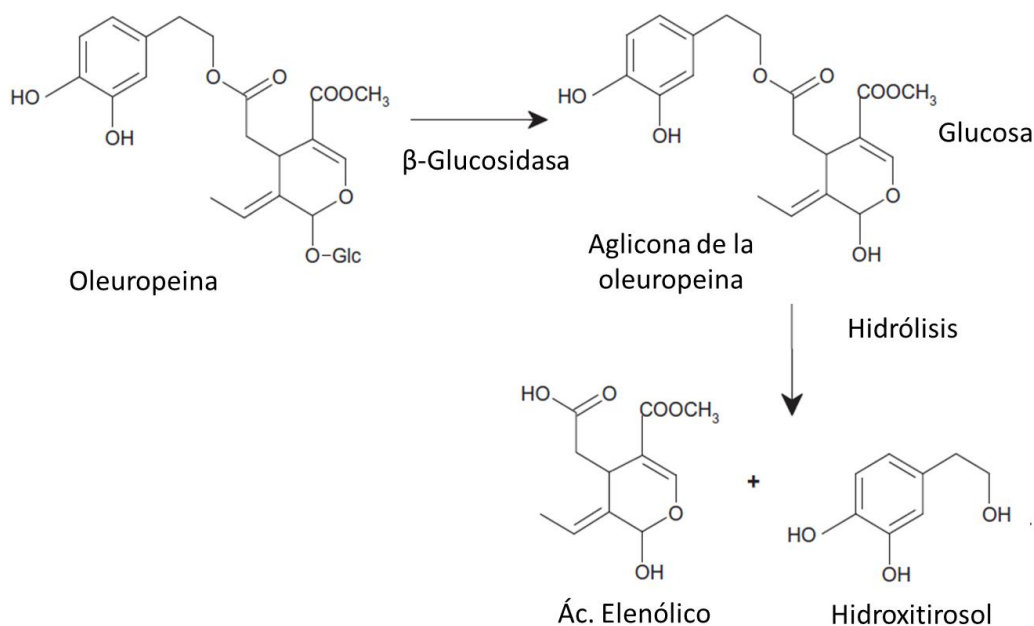


Figura 4. Biosíntesis del hidroxitirosol. Adaptado de Vissers y cols. (2002)

INTRODUCCIÓN

La cantidad de HxT en el aceite de oliva varía entre 100 y 600 mg/kg, esta cantidad se ve modificada por factores como la variedad, la maduración de las aceitunas, el proceso de extracción del aceite de oliva o incluso los factores agronómicos y medio-ambientales. Sin embargo, aproximadamente la mitad de los polifenoles totales corresponden al HxT y sus derivados (**Figura 5**) [79,80].

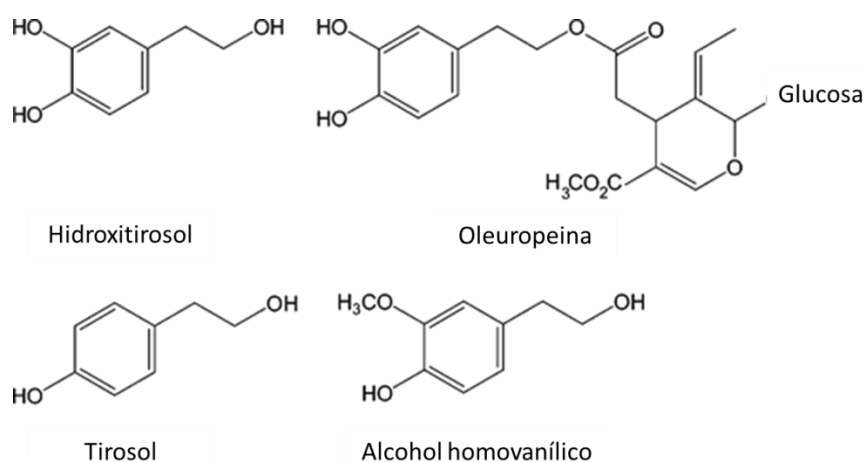


Figura 5. Compuestos fenólicos mayoritarios del aceite de oliva.

Diversos estudios en humanos y en animales de experimentación han demostrado que los fenoles de aceite de oliva, y específicamente el HxT y sus derivados, son biodisponibles de manera dosis-dependiente [81]. En un estudio en el que el HxT se administró por vía oral, se demostró que hasta el 66% de los fenoles de aceite de oliva ingeridos se absorbían en el intestino delgado [78]. La absorción del HxT es rápida, alcanzando la concentración plasmática máxima después de 5-10 minutos de su ingesta, seguida de un rápido descenso [82]. La absorción de este compuesto depende en gran medida del vehículo de administración. Tuck y cols. [83] demostraron que las ratas absorbían el 75% o 99% del HxT cuando se les administraba en una solución acuosa o empleando un vehículo a base de aceite respectivamente. En línea con estos resultados, Visioli y cols. [84] observaron una mayor excreción de HxT en humanos que en ratas, después de su administración como componente natural de aceite de oliva (44,2%), como ingrediente añadido en aceite de oliva refinado (23%), o en una matriz de yogur (13%).

Diversos estudios muestran que hasta un 80% de la cantidad ingerida de HxT se excreta por orina [85,86]. Más del 90% de los metabolitos urinarios fueron compuestos conjugados [78,85-89], principalmente metabolitos glucuronidados. También se detectó la presencia de fenoles libres y metil-conjugados. Así mismo, se identificaron compuestos sulfo-conjugados derivados de HxT y otros metabolitos propios de la fermentación colónica de polifenoles, tales como 3,4-dihidroxifenil-acetaldehído y el ácido 3,4-dihidroxifenilacético, después de la administración por vía oral o intravenosa [82,90]. En este sentido, el HxT podría considerarse un biomarcador útil de la ingesta de los productos que lo contienen, ya que su recuperación en la orina ha demostrado una alta correlación con la dosis administrada [91].

En cuanto a la toxicidad del HxT, D'Angelo y *cols.* [82] hallaron, en un estudio en ratas, que la administración por vía oral de hasta 2 g/kg de HxT en ratas no produjo ningún efecto tóxico. Resultados similares fueron observados por Soni y *cols.* [92] que demostraron que un extracto rico en HxT (50% del 70% del extracto en peso) no presentó toxicidad a niveles de hasta 2 g/kg/día. En el ensayo de micronúcleos *in vivo*, la ingesta de HxT a dosis de hasta 5 g/kg/día durante 29 días no produjo incremento en el recuento de eritrocitos policromatófilos o de reticulocitos en la médula ósea. El consumo de HxT se considera seguro a niveles de hasta 20 mg/kg/día según los estudios disponibles del extracto y los polifenoles libres y aislados. Los ensayos de toxicidad crónica a 90 días confirmaron la ausencia de efectos tóxicos a dosis de 2g/kg/día, así como la ausencia de efectos teratogénicos y mutagénicos [93].

1.3.2.2 Hidroxitirosol como antioxidante

La actividad antioxidante del HxT ha sido ampliamente estudiada en sistemas modelo en los que las especies reactivas de oxígeno (ROS) y otros radicales son generados por diferentes agentes. En comparación con otros compuestos fenólicos, incluyendo el tirosol, el HxT demuestra un carácter antioxidante mucho más eficaz. Como regla general, la estructura *o*-dihidroxilada del HxT y oleuropeína confiere mayor actividad antioxidante, seguida por compuestos del tipo 4-*O*-monohidroxiladas (ligustrósido y tirosol) y catecoles

INTRODUCCIÓN

3-O-hidroxi-sustituidos. Todos estos derivados son antioxidantes más potentes que el ácido ascórbico o el α -tocoferol [90,94,95]. Se ha demostrado que el HxT tiene actividad antioxidante *in vitro*, eliminando radicales peroxilo, hidroxilo y otros radicales libres, especies reactivas de nitrógeno y aniones superóxido, deteniendo las reacciones en cadena de peroxidación y evitando la producción catalizada por iones metálicos de ROS [80,96].

Aunque la actividad antioxidante del HxT siempre ha sido relacionada con su estructura química y su capacidad para actuar en reacciones de óxido-reducción [97], estudios recientes apoyan firmemente que el HxT también puede ofrecer una protección antioxidante indirecta al inducir la activación de los sistemas de defensa endógena [98,99]. De hecho, Martín y cols. [100] confirmaron que el HxT incrementó la actividad de algunas enzimas antioxidantes, actuando indirectamente como regulador de la protección celular contra el estrés oxidativo.

Teniendo en cuenta la actividad antioxidante inherente del HxT, podría señalarse que dicho compuesto podría estar implicado en la prevención de patologías como cáncer, ECV, trastornos neurodegenerativos, DMT2, etc., donde la etiología y la progresión de la enfermedad se han relacionado con la lesión tisular mediada por ROS. Los biomarcadores de daño oxidativo basados en la medición de varios productos de oxidación relativamente estables, derivados de daño al ADN, oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL) o glutatión reducido (GSH) entre otros, han permitido confirmar la extensa actividad biológica detallada para este compuesto [101].

Por su alta capacidad antioxidante puede ser empleado como ingrediente funcional, principalmente en alimentos con alto contenido en AGP, ya que es capaz de protegerlos de la oxidación lipídica. Además, tiene la ventaja, en comparación con los antioxidantes sintéticos, ser de origen natural. En este sentido, en un estudio realizado por Cofrades y cols., determinaron que el HxT a una concentración de 100 ppm, proporciona mayor capacidad antioxidante que los compuestos sintéticos butil

hidroxianisol (BHA) y butil hidroxitolueno (BHT) en emulsiones aceite en agua (O/W), homogenizados de cárnicos cocidos y salchichas tipo Frankfurt [74].

1.3.2.3 Hidroxitirosol en enfermedades cardiovasculares

Los efectos en la prevención y tratamiento de ECV del aceite de oliva se atribuyen en gran medida a su alto contenido en ácidos grasos AGM, pero también a los compuestos fenólicos que contiene, como el HxT. En este sentido, el estudio EUROLIVE realizado en 200 hombres sanos, demostró que la ingesta de tres tipos de aceite de oliva virgen con diferente contenido fenólico aumentó los niveles plasmáticos de HDL-colesterol y redujo el daño causado por la peroxidación lipídica de forma dosis-dependiente [102]. Resultados similares fueron encontrados por Marrugat *y cols.* [103], quienes señalaron que la ingesta de aceite de oliva virgen de alto contenido fenólico inhibió la formación de peróxidos lipídicos. Además, Visioli, *y cols.* [104] demostraron en 98 voluntarios que los compuestos fenólicos derivados del aceite de oliva aumentaban los niveles plasmáticos totales de glutathione. Estos resultados indican la capacidad del HxT para prevenir la oxidación de LDL y mejorar el perfil lipídico después de su consumo continuo.

También se han descrito efectos del HxT en la agregación plaquetaria y en inflamación. Así, Pacheco *y cols.* [105] observaron una disminución postprandial en la adhesión celular después de la ingesta de aceite de oliva virgen en comparación con el aceite de oliva refinado. Sin embargo, el consumo de aceite de oliva virgen rico en compuestos fenólicos por pacientes con enfermedad coronaria estable no influyó significativamente en la concentración plasmática de VCAM-1 e ICAM-1 [106]. En relación con los beneficios del HxT sobre la función plaquetaria, Dell'Agli *y cols.* [107] confirmaron su capacidad para inhibir la agregación plaquetaria *in vitro*. Este efecto fue corroborado por Carluccio *y cols.* que lo asociaron a una disminución en la adhesión de monocitos al endotelio y menor producción de VCAM-1 [108]. Por otro lado, la ingesta de aceite de oliva virgen de alto contenido fenólico en 21 voluntarios hipercolesterolémicos disminuyó el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) y el factor VII, asociado con cambios en el perfil hemostático postprandial, conduciendo a un estado menos trombogénico.

Sánchez-Muniz *y cols.* [109] y Oubiña *y cols.* [110] observaron en mujeres postmenopáusicas que tanto la agregación plaquetaria como la producción de tromboxano A₂ (TXA₂) y prostaciclina I₂ (PGI₂) diferían tras el consumo de dietas idénticas elaboradas con dos aceites monoinsaturados (oliva virgen extra y girasol alto oleico) cuyo perfil era similar en ácidos grasos, pero muy distinto en compuestos polifenólicos (p.e HxT).

En cuanto al desarrollo de lesiones ateroscleróticas, un estudio realizado en conejos hiperlipidémicos alimentados con una dieta suplementada con HxT mostró una mejora del estado antioxidante y una reducción del tamaño de las lesiones ateroscleróticas en comparación con los controles [111].

Las concentraciones elevadas de marcadores de inflamación se asocian con un aumento del riesgo cardiovascular. Por lo tanto, la reducción de los niveles de tromboxano B₂ y de leucotrieno B₄, como agentes proinflamatorios, se ha estudiado previamente [110,112]. En cuanto a la citoquina proinflamatoria y la proteína C reactiva, mejoraron significativamente después del consumo de aceite de oliva virgen rico en compuestos fenólicos en pacientes con enfermedad coronaria estable [106]. Recientemente se ha evaluado la actividad del HxT preparada en una mezcla de aproximadamente el 20% de este polifenol en ratas a las que se les había inducido inflamación aguda con carragenano. Los roedores recibieron dosis diferentes (100, 250 y 500 mg/kg de peso corporal) por vía oral de HxT. Este producto inhibió significativamente tanto la inflamación aguda como el dolor asociado con la administración de carragenano. No obstante, la acción analgésica de HxT no mostró una relación dosis-dependiente, aunque fue capaz de disminuir las citoquinas pro-inflamatorias IL-1 β y TNF- α , pero no de aumentar la expresión de RNAm de la citocina IL-10 antiinflamatoria de [113].

1.3.2.4 Hidroxitirosol en Diabetes Mellitus

El estrés oxidativo también juega un papel crucial en la patogénesis de la resistencia a la insulina y se ha planteado la hipótesis de que los antioxidantes de la dieta podrían disminuir el riesgo futuro de padecer diabetes. Por lo tanto, el seguimiento de dietas

variadas ricas en polifenoles, y en particular en HxT, podrían contribuir a mejorar la homeostasis de la glucosa y ayudar en la prevención de la Diabetes Mellitus.

En este sentido, diferentes estudios prospectivos de observación y los estudios de intervención apoyan una relación inversa entre la dieta mediterránea y la resistencia a la insulina [114]. A este respecto, publicaciones de nuestro grupo muestran como los hijos de madres cuya adherencia a la dieta mediterránea era baja mostraron al nacimiento un perfil de niños prediabéticos, con niveles de marcadores de resistencia y sensibilidad a la insulina alterados, mientras que aquellos cuyas madres siguieron dietas con adecuada adherencia a la dieta mediterránea no presentaban tales niveles alterados [115]. No sólo eso, la adherencia a la dieta mediterránea durante el embarazo anulaba los efectos adipogénicos y diabetogénicos atribuidos a polimorfismos en uno de los genes más predictivos de obesidad, el gen FTO (de la terminología inglesa *Fat mass and obesity-associated protein*), mostrando los hijos de esas madres un perfil de marcadores de resistencia/sensibilidad a la insulina más adecuado al nacimiento [116].

Teniendo en cuenta que el HxT está implicado en la prevención del estrés oxidativo, se ha evaluado el efecto en ratas diabéticas en un modelo de inducción por aloxano. Los resultados confirmaron la capacidad del HxT para inhibir el estrés oxidativo [117,118] e hiperglucemia [117]. Del mismo modo, los polifenoles obtenidos del extracto de hoja de olivo, como la oleuropeína y el HxT, revertieron la inflamación crónica y el estrés oxidativo que induce los síntomas cardiovasculares, hepáticos y metabólicos en este modelo de obesidad inducida por dieta y diabetes [119]. Hamden y cols. [120] encontraron en ratas diabéticas una acción inhibitoria del HxT de la toxicidad pancreática después de consumir dietas suplementadas con este compuesto.

1.3.3 Silicio

El silicio es el segundo elemento más abundante de la tierra, con un 27% de la masa total de la misma, sólo por detrás del oxígeno que supone aproximadamente el 45%. La distribución en los ecosistemas es extensa, encontrándose principalmente en los componentes minerales del suelo, en la composición de organismos vegetales, animales y

agua. Debido a su naturaleza atómica, el silicio se puede encontrar en diferentes formas químicas (orgánicas e inorgánicas) [121,122].

A lo largo de la historia, el silicio ha sido estudiado más por sus efectos negativos a la salud que por sus beneficios a ella. La falta de información acerca de todas las posibles estructuras y compuestos que su naturaleza intrínseca genera, ha sido la causa por la que la investigación de este metaloide se derive hacia los efectos más evidentes en los organismos vivos. Recientemente ha surgido un interés por elucidar los efectos del silicio sobre la salud, así como sus mecanismos de acción [123,124].

1.3.3.1 Características generales

Químicamente, el silicio es capaz de formar compuestos de manera similar al carbono, uniéndose por medio de enlaces covalentes con átomos de oxígeno, nitrógeno e hidrógeno. Generalmente, los enlaces Si-C no participan en procesos bioquímicos. Las diferencias entre la química del silicio y la del carbono se deben fundamentalmente a la menor electronegatividad del silicio y su mayor peso atómico. Por ello, los enlaces Si-Si, a diferencia de los enlaces C-C, son muy débiles e inestables en presencia de agua.

El silicio reacciona fácilmente con oxígeno molecular y agua, los productos de reacción con oxígeno son compuestos del tipo siloxano (Si-O-Si) los cuales poseen una gran estabilidad en su estructura [123]. Este tipo de compuestos se encuentran generalmente como componente de formaciones geológicas. Se considera silicato a cualquier compuesto que contenga silicio y oxígeno como anión (SiO_4^{2-}). Los silicatos pueden formar compuestos con muchos cationes diferentes. En la naturaleza los más abundantes son los aluminosilicatos o zeolitas [125,126]. Otra forma química abundante del silicio son los óxidos. El dióxido de silicio (SiO_2) es el compuesto más abundante de la naturaleza. Se puede encontrar de forma monomérica soluble como ácido silícico (H_4SiO_4) o como compuesto polimerizado prácticamente insoluble [124].

En los organismos vivos, el silicio forma parte de estructuras de sostén como los esqueletos de las diatomeas (organismos unicelulares) y esponjas silíceas (organismos

INTRODUCCIÓN

pluricelulares primitivos), así como los huesos de los animales superiores. El silicio contenido en organismos vivos proviene de la absorción del componente terrestre.

El ácido ortosilícico (**Figura 6**) es la forma más biodisponible por su solubilidad y estabilidad en agua [127]. Por otra parte, se ha descrito que ciertas formas insolubles como el ácido silícico coloidal, sílica gel y zeolitas pueden liberar pequeñas cantidades de silicio soluble en los compartimentos biológicos aunque depende de las características fisicoquímicas específicas de cada molécula y las condiciones del medio de dispersión [124].

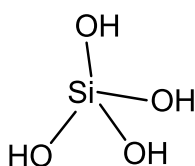


Figura 6. Estructura del ácido ortosilícico

1.3.3.2 Silicio en la alimentación

Los alimentos vegetales presentan mayor contenido de silicio que los alimentos de origen animal [128]. Principalmente, el silicio se encuentra en cereales integrales, hortalizas como las judías verdes y frutas como el plátano. Aunque el contenido de silicio en este tipo de alimentos es alto, la biodisponibilidad del mismo es baja debido a la forma polimérica en la que se encuentra [129]. El consumo de productos derivados de granos (cereales, harinas, pastas, masas, hojaldres, y arroz no integral) contribuyen en un 14% a la ingesta total de silicio, mientras las hortalizas contribuyen un 8% [130]. El aporte de silicio de una dieta rica en fibra es aproximadamente el doble que el de una dieta pobre en fibra [129].

Otra fuente de silicio en la dieta son las bebidas como el agua, café y cerveza. El consumo de estas bebidas supone más del 55% de la ingesta total de silicio [130]. La cerveza por su contenido en cebada y lúpulo, es la fuente mayoritaria de silicio con concentraciones entre 9 y 39 mg/L [131,132]. El contenido de silicio en el agua varía desde 1 hasta 100mg/L [133].

El silicio como aditivo alimentario suele añadirse formando parte de los agentes antiaglomerantes, espesantes, estabilizantes y clarificantes [134]. Sin embargo, en estos aditivos el silicio se encuentra en forma de silicatos poliméricos que son de muy baja biodisponibilidad. Los suplementos de silicio constituyen una fuente alternativa ya que contienen ácido ortosilícico u otras formas fácilmente solubles en agua y por tanto de más fácil absorción [135,136].

1.3.3.3 Silicio en la salud

Aunque existe evidencia de que la ingesta de silicio puede ejercer efectos beneficiosos sobre la salud; sin embargo, las ingestas de referencia no han sido completamente establecidas. El silicio como micronutriente se encuentra a una concentración de 1-2 g en el cuerpo humano y debe suministrarse por vía exógena [137]. El Comité de Expertos en Vitaminas y Minerales estima que el consumo máximo debe ser de 560 mg/día considerando como fuentes de silicio los alimentos, los suplementos y el agua de bebida [138]. A partir de estudios de toxicidad realizados en animales, se estableció una ingesta máxima tolerable de 700 mg/día de silicio, que equivale a 1500 mg/día de SiO₂ [137]. La dosis sin efecto adverso observado (NOAEL) se sitúa, sin embargo, por encima de los 5000 mg/kg en humanos [138], de 2500 mg/kg en ratas y de 7500 mg/kg en ratones [139].

Los principales efectos del silicio se relacionan con la mineralización ósea, disminución del riesgo de ECV y de enfermedades neurodegenerativas [127], y prevención del envejecimiento dermatológico. Así, el tratamiento con ácido ortosilícico mejora el estado de la epidermis y las propiedades mecánicas de la piel, uñas y pelo. Estos efectos fueron relacionados con la producción de colágeno y glucosaminoglicanos [135]. Una función del de la cual hay pocos estudios, es la relacionada con el sistema inmunitario. En un estudio se aprecia de forma clara un considerable aumento en el número de linfocitos e inmunoglobulinas en un grupo de pacientes tratados con silicio comparado con el grupo control. También se ha observado que la deficiencia de silicio en el organismo debilita la proliferación de linfocitos esplénicos en respuesta a un posible agente infeccioso [140].

INTRODUCCIÓN

La mayor concentración de silicio en el organismo se encuentra en el tejido conectivo y elástico, principalmente en aorta y otras arterias, donde actúa como un agente estabilizador del colágeno fortaleciendo el tejido vascular [141,142]. Por ello, se ha reconocido al silicio, como elemento traza protector en el proceso de aterosclerosis y otras alteraciones cardiovasculares [141,142]. Diversos estudios demuestran que en la fase inicial del desarrollo de la placa de ateroma se produce un descenso de los niveles de silicio en la pared arterial, lo cual podría indicar que la deficiencia de silicio causa un debilitamiento inherente de las paredes de los vasos sanguíneos [143-145].

En relación a los factores de riesgo de ECV, hay evidencias de que el silicio es capaz de disminuir los niveles plasmáticos de colesterol a través de un mecanismo de reducción de las VLDL y LDL [146,147]. La relación entre silicio y ECV ha sido demostrada en estudios epidemiológicos. En EEUU se observó una elevada incidencia de muertes súbitas, enfermedades cerebrovasculares, hipertensión arterial y enfermedad coronaria en zonas de consumo de aguas blandas. La información se correlacionó con los resultados de la población tras el consumo de aguas duras, enfatizando el posible efecto protector de metales como calcio, magnesio, manganeso y silicio [148].

La capacidad del silicio para inhibir o disminuir el desarrollo de Diabetes Mellitus ha sido estudiada relacionando la función de los micronutrientes en la regulación del metabolismo y la expresión de genes asociados con la glucemia [149]. Oschilewski y cols. [150] observaron en un estudio en ratas propensas a síndrome metabólico que la administración de silicio inhibió casi por completo el desarrollo de diabetes. El efecto antidiabético se atribuyó a un descenso en la infiltración de macrófagos en los islotes de Langerhans. También se ha demostrado que el silicio promueve la reducción de los niveles de glucemia, incrementa la sensibilidad a la insulina, y mejora la respuesta a leptina y adiponectina [151].

1.3.3.4 Silicio como antioxidante

La capacidad antioxidante del silicio ha sido estudiada en muchas especies vegetales en situaciones de estrés, como el exceso de sal en cultivos de cebada [152,153] y pepino

[154], y situaciones de sequía en cultivos de trigo [155,156]. La mayoría de las hipótesis atribuyen los beneficios del silicio al aumento en la actividad de algunas de las enzimas antioxidantes y a que favorece la disminución en los niveles de lipoperóxidos (LPO) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

Son pocos los estudios de silicio en mamíferos que estudian su capacidad antioxidante. González-Muñoz y cols. demostraron un aumento de la expresión de enzimas antioxidantes cerebrales en ratones intoxicados con aluminio y tratadas con silicio, aunque estos autores lo atribuyen en parte, a la disminución del contenido en aluminio en cerebro [157], y más recientemente a que el silicio bloquea parcialmente el desbalance mineral que el aluminio produce [158]. Kim y cols. [159] observaron una gran capacidad para inhibir radicales libres *in vitro* mediante las técnicas del 2,2 difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH), la capacidad antioxidante reductora de hierro (FRAP), y la capacidad de absorción de radicales de oxígeno (ORAC) [157,159].

1.4 Síndrome metabólico

Se conoce como síndrome metabólico al conjunto de alteraciones metabólicas que incluyen, además de obesidad, dos de las siguientes patologías: hipertensión, hiperglucemia en ayunas, hipertrigliceridemia y niveles bajos de HDL-colesterol [160,161]. No obstante, no existe acuerdo entre las diferentes entidades, y algunas no demandan que entre los tres factores alterados se encuentre elevado un marcador de obesidad abdominal (el índice de masa corporal o IMC o el perímetro de cintura) [162].

El síndrome metabólico fue descrito por primera vez en 1923 como la conjunción de obesidad, hipertensión, hiperglucemia e hiperuricemia [163]. Sin embargo, hasta 1998 cuando no se produjo una iniciativa para desarrollar una definición reconocida internacionalmente de este síndrome y de las manifestaciones clínicas y epidemiológicas que incluye. En este sentido, distintos grupos de expertos han propuesto definiciones variadas, siendo las más aceptadas las de: El *National Cholesterol Education Program's Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III)*, la Organización Mundial de la Salud (OMS), el *European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR)*, y la *Internacional Diabetes*

INTRODUCCIÓN

Federation (IDF) [160,164]. Todas ellas coinciden en señalar como sus componentes esenciales la obesidad, resistencia a la insulina, y dislipemia e hipertensión. Entre estas definiciones existen diferencias en los criterios clínicos y epidemiológicos que dificultan su utilidad en la comparación de incidencia entre distintos tipos de poblaciones (**Tabla 3**).

Tabla 3. Criterios clínicos para diagnosticar el síndrome metabólico

	OMS (1999)	EGIR (1999)	NCEP ATPIII (2001)	IDF (2005)
Criterio mínimo	Intolerancia a la glucosa, diabetes, resistencia a la insulina y al menos dos de los siguientes:	Resistencia a la insulina (insulinemia $>P_{75}$ de la población sana) y al menos dos de los siguientes:	Tres o más de los siguientes factores:	Obesidad central y al menos dos de los siguientes:
Glucemia en ayunas		≥ 110 mg/dL sin DMT2	≥ 100 mg/dL	≥ 100 mg/dL
Presión arterial	$\geq 140/90$ mmHg	$\geq 140/90$ mmHg o en tratamiento	$\geq 130/85$ mmHg	$\geq 130/\geq 85$ mmHg
Trigliceridemia	≥ 150 mg/dL	≥ 178 mg/dL o en tratamiento	≥ 150 mg/dL	≥ 150 mg/dL o en tratamiento
HDL-colesterol	< 35 mg/dL ♂ < 39 mg/dL ♀	< 39 mg/dL o en tratamiento	< 40 mg/dL ♂ < 50 mg/dL ♀	< 40 mg/dL ♂ < 50 mg/dL ♀ o en tratamiento
Obesidad	ICC > 0.9 ♂ ICC > 0.85 ♀ IMC > 30 kg/m ²	Perímetro abdominal > 94 cm ♂ > 80 cm ♀	Perímetro abdominal > 102 cm ♂ > 88 cm ♀	Según etnia
Microalbuminuria	≥ 20 µg/min o cociente albumina/creatinina ≥ 30 mg/g			

DMT2, Diabetes Mellitus tipo 2; HDL, lipoproteínas de alta densidad; ICC, índice cintura/cadera. Adaptado de Alberti, Zimmet y Shaw (2006).

La prevalencia del síndrome metabólico va aumentando a nivel mundial y tiene una amplia incidencia en el desarrollo socioeconómico [162]. En España, esta prevalencia se situaría alrededor del 4% en adolescentes [165], llegando hasta un máximo de 61,7% en mujeres postmenopáusicas [166].

1.4.1 Obesidad

La obesidad es una enfermedad metabólica crónica que durante las últimas décadas ha crecido exponencialmente. Constituye un grave problema de salud pública a nivel mundial. Tanto es así, que ha sido definida como la pandemia del siglo XXI por la

INTRODUCCIÓN

International Obesity Task Force (IOTF) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) [1,162].

Se define como un aumento en el número y tamaño de los adipocitos que forman el tejido adiposo, lo cual se traduce en una acumulación excesiva del tejido graso y, por lo tanto, un aumento del peso corporal, por encima del recomendado, aunado a cambios en funciones endocrinas y metabólicas del cuerpo. Hennekens y Andreotti [167] estudiaron que las personas con índices de masa corporal entre 22-25 kg/m² presentan la menor tasa de mortalidad, incrementándose la mortalidad un 30% por cada 5 kg/m² de elevación en el IMC. Se distinguen fundamentalmente dos patrones de obesidad: la de tipo ginoide o periférica; y la denominada abdominal, androide o central, donde el exceso de grasa es principalmente almacenado en el abdomen y que ha sido relacionada directamente con el incremento de las tasas de mortalidad y otros estados patológicos [162,168].

La obesidad se caracteriza por disminuir la calidad y la esperanza de vida de quien la padece, siendo un factor de riesgo para: DMT2, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina, dislipidemias, hipertensión arterial, hiperuricemia, accidentes cerebrovasculares, gasto cardíaco aumentado, reflujo gastroesofágico, cálculos vesiculares, hígado graso, apnea del sueño, roncopatías, dificultad respiratoria, psoriasis, alteraciones menstruales, varices, artritis y artrosis de grandes articulaciones, compresión de la columna y algunos tipos de cáncer [162,169,170]. Además, se calcula que entre el 2 y el 8% del total del gasto sanitario en España es atribuible a esta patología [171]. Entre los factores que se implican en el desarrollo de la obesidad se encuentran [171-180]:

- Exceso de ingesta energética (generalmente en forma de grasas saturadas y azúcares refinados).
- Escasa actividad física.
- Factores genéticos como: mutaciones en el receptor 4 de la melanocortina, cambios en la función/expresión de leptina o en su receptor. Si bien la obesidad se considera que tiene fundamentalmente origen poligénico, habiéndose definido la importancia de ciertos polimorfismos como los del gen FTO, Apo A4, perilipina [181].

INTRODUCCIÓN

- Factores endocrinos: hipotiroidismo, síndrome de Cushing, hipogonadismo, lesiones hipotalámicas, déficit de la hormona del crecimiento, resistencia a la leptina, hiperinsulinemia, etc.
- Factores psicológicos: consumo compulsivo de comida o la adicción a los alimentos.
- Factores neurológicos y psicológicos: relacionados principalmente con la función del hipotálamo, respuesta a hormonas, neurotransmisores y neuropéptidos.
- Factores socioculturales: estilo de vida que promueve dietas poco saludables.
- Factores ambientales: disruptores endocrinos que por su similitud estructural con determinadas hormonas interactúan en rutas metabólicas.
- Factores microbiológicos: la microbiota natural del organismo que se modifica por factores dietéticos y nutricionales.
- Otros factores: edad, sexo, condición fisiológica, estrés, tabaquismo, drogas, etc.

El tratamiento de la obesidad debe ser personalizado, comenzando siempre por el tratamiento de la causa desencadenante, si existe, la dieta de restricción calórica y el ejercicio, tratamiento conductual, farmacológico y/o cirugía bariátrica. La prevención de esta patología es complicada debido a que es necesario el conocimiento en los patrones alimenticios y hábitos saludables [182,183].

1.4.2 Diabetes Mellitus

La diabetes es una patología caracterizada por una alteración en el metabolismo de la insulina, resultando en una hiperglucemia prolongada. Los síntomas clásicos son sed excesiva (polidipsia), micción frecuente (poliuria) y hambre constante (polifagia). La hiperglucemia prolongada ha sido asociada con daños a largo plazo en el organismo como disfunción e insuficiencia de órganos, principalmente ojos, riñones, y sistema circulatorio [184].

En la actualidad, la diabetes se ha clasificado en diferentes tipos, en función a sus características fisiopatológicas [184]:

INTRODUCCIÓN

- *Diabetes mellitus tipo 1 (DMT1)*: Las células β del páncreas son destruidas por una reacción autoinmune y, por lo tanto, el paciente es incapaz de producir insulina. Suele manifestarse en la infancia o la adolescencia. La causa de esta enfermedad parece estar relacionada con factores genéticos y ambientales, aunque no ha sido completamente definida.
- *Diabetes mellitus tipo 2 (DMT2)*: Se produce por una resistencia de los tejidos periféricos (fundamentalmente músculo e hígado) a la insulina con elevación marcada de la producción y secreción de la hormona. En estados muy avanzados de enfermedad, la resistencia a la insulina puede combinarse con una deficiencia de la producción de la misma [185]. Un 90-95% del total de los diabéticos padece DMT2, siendo esta modalidad la que está más relacionada con el síndrome metabólico. Su aparición depende de factores genéticos, ambientales, socioeconómicos, pero fundamentalmente del estilo de vida, entre lo que destaca el sedentarismo y las dietas inadecuadas. Se ha propuesto que incluso la disponibilidad de nutrientes del feto durante el embarazo afectaría al riesgo de padecer este tipo de diabetes [186].
- *Diabetes gestacional*: Se define como la intolerancia a la glucosa que aparece o se detecta durante el embarazo, poniendo en riesgo la salud de la madre y del feto. En la mayoría de los casos se normaliza tras el parto, aunque aumenta el riesgo de la mujer de padecer posteriormente DMT2 [186,187].
- *Diabetes tipo MODY (Maturity Onset Diabetes of the Young)*: Aparece antes de los 25 años y se caracteriza por un defecto en la producción de insulina sin resistencia a la misma, debido a un defecto hereditario en el factor nuclear hepático 1- α o en la glucoquinasa hepática (GK), disminuyendo así la función de las células β [188].

Los criterios diagnósticos propuestos por la Asociación Americana de Diabetes (ADA) en 1997 y que han sido aceptados por el comité asesor de la OMS y el Consenso Europeo[189] (*European Diabetes Policy Group*) son los siguientes:

- Glucemia basal en plasma ≥ 126 mg/dL (≥ 7 mmol/L). Mínimo dos determinaciones en días diferentes para confirmar el diagnóstico.

- Síntomas típicos de diabetes y glucemia al azar ≥ 200 mg/dL ($\geq 11,1$ mmol/L). No es necesaria una segunda determinación.
- Hemoglobina glicosilada (HbA1c) por encima de $\geq 6,5\%$ en dos determinaciones.
- Glucemia a las 2 h de la sobrecarga oral con 75 g de glucosa ≥ 200 mg/dL ($\geq 11,1$ mmol/L). Se considerara un estado de prediabetes si la glucosa basal se sitúa entre 100 y 126 mg/dL (5,6 y 7 mmol/L, respectivamente) entre 140 y 200 mg/dL (7,8 y 11,1 mmol/L, respectivamente) tras el test de glucemia con 75 g de glucosa. En este estado existiría una alteración de la glucemia en ayunas, intolerancia a la glucosa o una combinación de ambas [190].

1.4.3 Resistencia a la insulina

La insulina es una hormona anabólica que se forma en las células β de los islotes de Langerhans del páncreas y cuya secreción se estimula como respuesta al incremento en los niveles plasmáticos de glucosa, aunque también pueden intervenir en dicha regulación otras sustancias como los ácidos grasos o diferentes aminoácidos como la arginina [191]. Una vez liberada, actúa sobre los tejidos sensibles a la insulina, produciendo diferentes acciones. La **Figura 7** representa un esquema de este mecanismo [11].

A nivel del músculo esquelético y adipocitos, los receptores de glucosa GLUT-4 migran a la membrana celular favoreciendo la entrada de glucosa a estos tejidos para su metabolismo. El exceso de glucosa se transforma en glucógeno en el tejido muscular, mientras que en los adipocitos pasaría a transformarse en glicerofosfato y a almacenarse en forma de triglicéridos [192].

En el hígado, la insulina estimula la síntesis de glucógeno y limita la gluconeogénesis y la glucogenolisis, evitando liberación de glucosa al plasma. Tanto en adipocitos como a nivel hepático, estimula la lipogénesis, inhibe la oxidación de ácidos grasos y aumenta la salida a plasma de AGL. En este punto, con la lipogénesis incrementada, los AGL no se oxidarían de manera apropiada, lo que generaría acumulación de grasa ectópica. En el hígado, puede producir esteatosis, hígado graso, fibrosis o esteatohepatitis no alcohólica (NASH), llevando al fallo hepático. En cuanto a la

INTRODUCCIÓN

producción de lipoproteínas, se ha observado que se reducen los niveles de HDL-colesterol y se estimula la producción de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL), aumentando la trigliceridemia, lo que puede desembocar en lipotoxicidad [193].

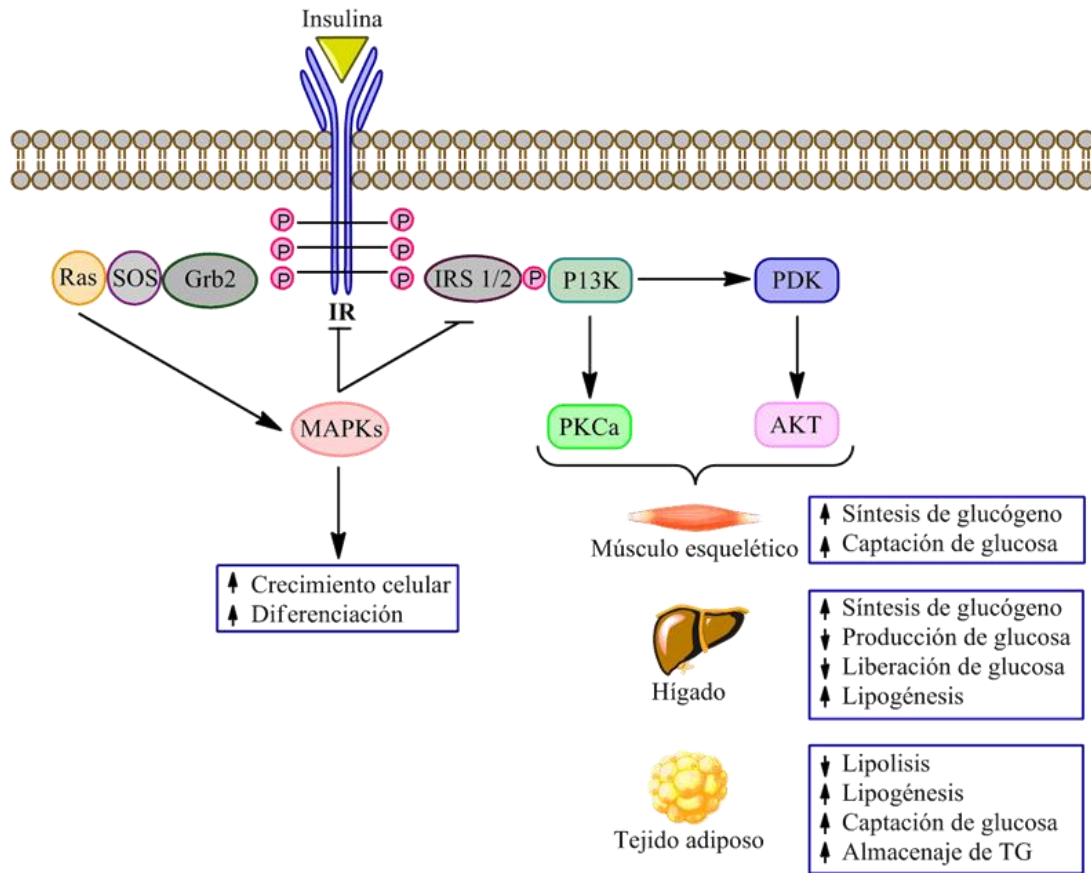


Figura 7. Efectos de la insulina sobre los diferentes tejidos en el ser humano y de los mecanismos implicados. AKT, proteínquinasa B; Grb2, proteína unida al factor de crecimiento 2; IRS, sustrato del receptor de insulina; MAPKs, proteínquinasas activadas por mitógenos; PDK, proteínquinasa dependiente del 3-fosfoinositol; PI3K, fosfatidil inositol-3-quinasa; PKCa, proteínquinasa C atípica. Adaptado de González-Torres (2016).

La resistencia a la insulina se define como una situación en la que determinada concentración de insulina no produce la respuesta adecuada en los tejidos sensibles a la hormona [194]. La etiología de su alteración no ha sido del todo clarificada y distintos factores, tanto genéticos como ambientales, contribuyen a su aparición, destacando entre ellos la obesidad y el sedentarismo. En los últimos años se ha propuesto que unos elevados niveles de AGL podrían ser el factor clave que relaciona obesidad y resistencia a la insulina [195].

INTRODUCCIÓN

El mecanismo propuesto de ésta alteración comienza con la hipersecreción de insulina por las células β -pancreáticas para intentar compensar la falta de sensibilidad a dicha hormona, lo cual genera hiperinsulinemia. No obstante, la hiperglucemia sigue mantenida, generando de esta forma glucotoxicidad en los tejidos. Si dicho daño se mantiene y progresa, las células β reducen la secreción de insulina; por consiguiente, en el hígado, músculo esquelético y tejido adiposo disminuye la captación de glucosa, incrementándose su producción a nivel hepático por falta de inhibición de la insulina sobre la gluconeogénesis, lo que contribuye a agravar la situación de hiperglucemia (**Figura 8**)[11,196-198]. Se genera así un ciclo donde los tejidos no son capaces de responder a la hormona, y en estados avanzados de la enfermedad las células β tampoco son capaces de producir suficiente cantidad de insulina, lo que conlleva a una hiperglucemia mantenida y por tanto al desarrollo de DMT2 [11,194,198].

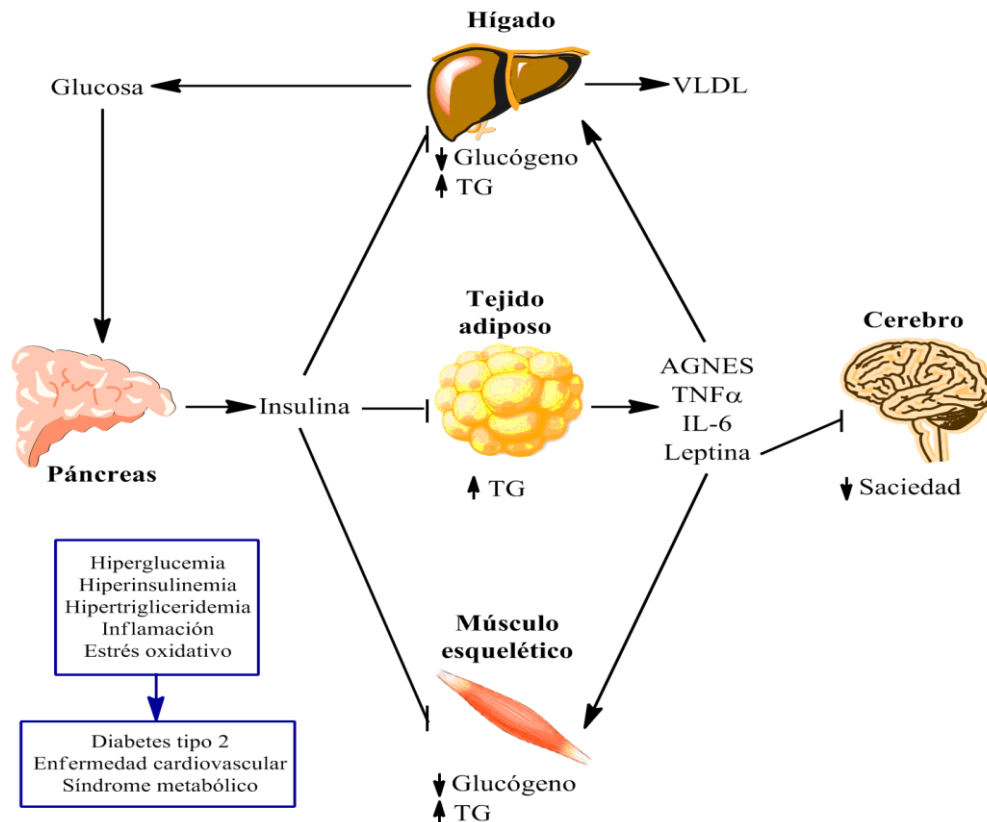


Figura 8. Alteraciones del metabolismo generadas por la resistencia a la insulina. AGNES, ácidos grasos no esterificados; TG, triglicéridos; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad; TNF- α , factor de necrosis tumoral α ; IL-6, interlequina 6. Adaptado de González-Torres (2016).

INTRODUCCIÓN

Randle y cols. [199] plantearon la relación entre el aumento de los AGL en plasma y la resistencia a la insulina, teoría que numerosos estudios han comprobado posteriormente. El mecanismo por el cual los AGL producen resistencia a la insulina parece deberse fundamentalmente a una alteración en la vía de señalización intracelular de la hormona, particularmente en la fosforilación del sustrato receptor de insulina (IRS) [200]. Estudios en humanos demuestran que elevadas concentraciones de AGL producen un depósito de lípidos y derivados lipídicos en el interior de las células musculares, los cuales contribuyen a la alteración de las vías de señalización activadas por la insulina mediante la inhibición de la fosforilación de proteína quinasa B (AKT) [201,202].

Dentro de los métodos para determinar sensibilidad a la insulina, el *clamp euglicémico* es considerado el método por excelencia para la confirmación diagnóstica de resistencia a la insulina, pero se trata de una técnica compleja e invasiva, la cual muchas veces resulta no apta para su aplicación a nivel poblacional [203] y tediosa cuando se trata de su aplicación en un número elevado de animales de experimentación. Los modelos de evaluación de la homeostasis como el HOMA (*Homeostatic Model Assessment*) o el QUICKI (*Quantitative insulin sensitivity check index*) de menor sensibilidad, pero más rápidos y poco invasivos son en la actualidad los más utilizados. En ellos se utilizan los datos de glucemia e insulinemia en ayunas para detectar la resistencia a la insulina (HOMA-IR), la sensibilidad de los tejidos (QUICKI y HOMA-S), la funcionalidad de las células- β pancreáticas (HOMA-B) y la disponibilidad de la insulina (HOMA-D) [204,205]. El HOMA-IR, desarrollado por Matthews y cols. en 1985 ha demostrado ser un buen equivalente de las mediciones de RI frente a pruebas como el *clamp euglicémico*, el *clamp hiperglicémico* o el modelo mínimo, en diferentes grupos de edad e incluso en pacientes diabéticos en tratamiento [206,207]. Muy recientemente se está utilizando el índice Triglicéridos-glucosa [208] ya que muestra buenas correlaciones con el HOMA-IR y presenta entre otras ventajas la determinación de triglicéridos en vez de insulina con el consiguiente abaratamiento de la evaluación de la insulino-resistencia [209].

1.4.4 Dislipemia

Los lípidos son transportados en el plasma sanguíneo a través de su unión con albúmina sérica o incorporados en unas partículas denominadas lipoproteínas. Esta segunda forma resulta mucho más práctica, ya que permite el transporte de cantidades mucho mayores de lípidos y su aporte selectivo a los tejidos y receptores [210].

En el interior de las lipoproteínas se sitúan los lípidos no polares (triglicéridos y colesterol esterificado), recubiertos por una cubierta muy similar a las membranas celulares, en la que se encuentran las proteínas (apo), el colesterol libre y los fosfolípidos, con la parte polar situada hacia el exterior. Estas apo pueden tener la función de señalización e interactuar con receptores u otras enzimas, o presentar alguna función enzimática o intercambiadora de lípidos (**Tabla 4**).

Tabla 4. Principales lipoproteínas y su función en el metabolismo

Lipoproteína	Proteínas	Función
QM	B-48	Transporte de TG a los tejidos (tejido adiposo, músculo e hígado)
VLDL	B-100, E, C-II	Transporte de TG a los tejidos
IDL	B-100, E	Transporte de TG al hígado
LDL	B-100	Transporte de colesterol a los tejidos
Lp (a)	B-100, (a)	Transporte de colesterol a los tejidos
HDL ₂	A-I, LCAT, LPT	Transferencia de colesterol
HDL ₃	A-I, LCAT, LPT	Esterificación de colesterol
HDL-colesterol	A-I	Transporte de colesterol a los tejidos ¹

¹Tejido adiposo, músculo e hígado. HDL, lipoproteínas de alta densidad; IDL, lipoproteínas de densidad intermedia; LCAT, lecitina-colesterol-aciltransferasa; LDL, lipoproteínas de baja densidad; Lp (a), lipoproteína (a); LPT, proteínas transferidoras de lípidos; QM, quilomicrones; TG, triglicéridos; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad. En la actualidad se han definido muchos subtipos de lipoproteínas, aunque evitaremos su detalle, por exceder el cometido de esta Tesis Doctoral. Adaptado de Sánchez-Pozo (2002).

Los triglicéridos (TG) procedentes de la dieta, después de su hidrólisis y reestructuración se empaquetan en los quilomicrones (QM), que son transportados a los tejidos para su uso. En el hígado, los lípidos provenientes de los QM remanentes, aquellos

INTRODUCCIÓN

formados a partir del exceso de hidratos de carbono o de los AGL que llegan del tejido adiposo blanco forman las VLDL (**Figura 9**) [211].

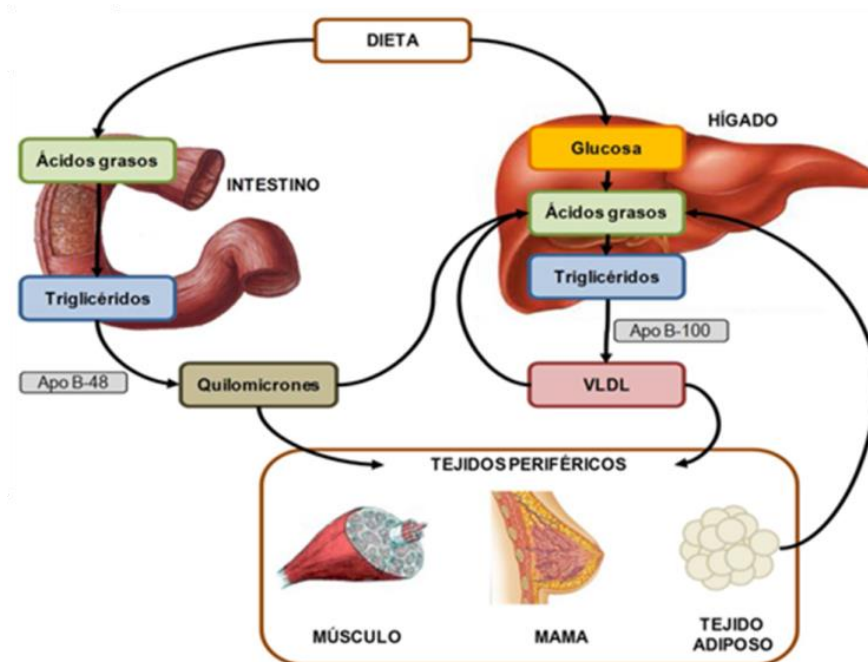


Figura 9. Grasa dietética y transporte de triglicéridos por los quilomicrones y VLDL. VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad. Adaptado de Vázquez-Velasco (2015).

Los tejidos, principalmente músculo y tejido adiposo, reciben ácidos grasos y glicerol provenientes de los QM y VLDL que son atacados por el enzima lipoproteín-lipasa (LPL), que se activa por la apo-CII de ambas lipoproteínas, comenzando la hidrólisis de TG, liberando los ácidos grasos al interior del tejido. Una vez que la LPL ha hecho su efecto, las lipoproteínas reducen su tamaño liberando parte de su capa externa, formándose dos partículas nuevas, los QM remanentes y las lipoproteínas de densidad intermedia (IDL). Las HDL se forman en el hígado y a partir de los restos liberados en la formación de QM remanentes e IDL. Todas las células del organismo, aunque fundamentalmente las hepáticas e intestinales, tienen capacidad para formar HDL nacientes. El mecanismo es dependiente de un transportador, el *ATP-binding cassette* (ABC), el cual puede tener diferentes isoformas [212]. El enzima lecitina-colesterol-aciltransferasa (LCAT) transfiere un ácido graso desde un fosfolípido al colesterol, esterificándolo. El colesterol esterificado se internaliza, haciendo que las pequeñas HDL₃ vayan llenándose de colesterol esterificado y adquiriendo forma la esférica típica de las HDL₂ (**Figura 10**) [211].

INTRODUCCIÓN

Las HDL, a través de las proteínas transferidoras de lípidos (LPT), como la proteína transferidora de ésteres de colesterol (CETP o LPT-1), intercambian los ésteres de colesterol por TG con las IDL, de manera que las IDL pasan a ser LDL y las HDL cargadas de triglicéridos podrían ser sustrato de la LPL tisular o bien ser hidrolizadas por la lipasa hepática (LH) con posible reutilización de las HDL. Se ha propuesto que las HDL son aclaradas del plasma al ser reconocidas por receptores *scavenger* tipo I (SR-B1), mecanismo que cerraría el transporte reverso de colesterol y aportaría este esteroide al hígado para ser transformado en ácido cólico por la acción de una isoforma de citocromo P450, la colesterol-7- α -hidroxilasa (CYP7A1).

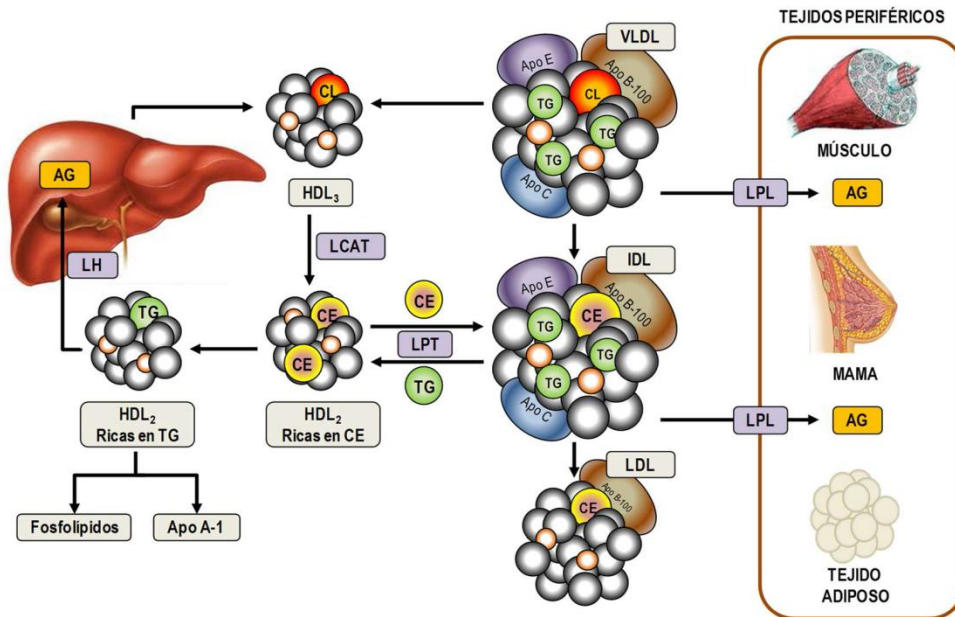


Figura 10. Transferencia de lípidos entre lipoproteínas. AG, ácidos grasos; Apo, apolipoproteína; CE, colesterol esterificado; CL, colesterol libre; HDL, lipoproteínas de alta densidad; LCAT, lecitina colesterol aciltransferasa; LDL, lipoproteínas de baja densidad; LH, lipasa hepática; LPL, lipoproteína lipasa; LPT, proteína transferidora de lípidos; TG, triglicéridos; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad. No se incluye la transferencia de fosfolípidos. Adaptado de Vázquez-Velasco (2015).

Las LDL transportan colesterol a los tejidos periféricos, fundamentalmente formadores de hormonas estrogénicas, con su receptor específico apo-B100/E. En el torrente del organismo son recogidas por los macrófagos, contribuyendo a la formación de almacenes ectópicos como los xantomas y xantelasmas. Si existe una gran cantidad de LDL circulantes, aportarían un exceso de colesterol a las células, lo que podría

INTRODUCCIÓN

comprometer su funcionalidad al perder flexibilidad las membranas celulares. Para evitar este exceso, las células esterifican el colesterol por medio de la acil-CoA-colesterol-aciltransferasa (ACAT) o bien impiden su entrada, de modo que la cantidad de LDL circulante aumentaría. Las lipoproteínas, preferentemente las LDL, pueden ser oxidadas, mecanismo que implica la imposibilidad de ser reconocidas por los receptores específicos de Goldstein y Brown, pero si por los receptores scavenger de macrófagos [213] contribuyendo al enriquecimiento de los tejidos en colesterol oxidado u oxisterol de probada capacidad aterogénica [214].

Aunque el organismo regula las concentraciones de lipoproteínas plasmáticas mediante la modificación de su síntesis o su eliminación, el exceso de síntesis o el defecto del aclaramiento de las mismas pueden incrementar el riesgo de sufrir diferentes patologías a largo plazo, tales como aterosclerosis, diabetes, o síndrome metabólico.

Se conoce como hiperlipidemia a los valores anormalmente elevados de colesterol y triglicéridos en el plasma sanguíneo. Los valores de LDL suelen aumentar con la edad (hasta los 50 años), y el consumo excesivo de AGS, entre otros factores [215], y son mayores en los varones y en las mujeres postmenopáusicas [216]. En DMT2 se produce un perfil lipoproteico que atañe fundamentalmente a las HDL y VLDL, sin afectar prácticamente a los niveles de colesterol transportado por las lipoproteínas de baja densidad (LDL-colesterol) [216]. No obstante, las LDL del paciente con DMT2 son pequeñas y densas, aspecto que les confiere capacidad para oxidarse, así como gran aterogenicidad. La confluencia de niveles elevados de VLDL, de incremento del número de LDL pequeñas y densas, y de bajos niveles de HDL-colesterol se conoce con el nombre de triada lipídica del diabético que explica el incremento del riesgo cardiovascular en la DMT2 [216].

Las hiperlipidemias son generalmente asintomáticas, y sólo en casos extremos (hiperlipemias familiares o monogénicas) se pueden observar depósitos de grasa en tendones y piel denominados xantomas y xantelasmas a nivel de los párpados. Los triglicéridos muy elevados pueden producir hipertrofias de hígado y bazo, pancreatitis,

INTRODUCCIÓN

entre otras lesiones. En la mayoría de los casos, las hiperlipidemias se deben a un desequilibrio en el consumo de los macronutrientes de la dieta (particularmente exceso de hidratos de carbono refinados y/o grasa saturada), aunque no se debe descartar el componente genético y la interacción dieta-genética en su origen y desarrollo [217,218].

Tabla 5. Valores normales de lípidos plasmáticos en humanos

Parámetro	Puntos de corte
Colesterol total	≤ 200 mg/dL
QM	Ausencia (tras 12 horas de ayuno)
VLDL	< 30 mg/dL
LDL	< 130 mg/dL
HDL	40 - 60 mg/dL ♂; 50 - 60 mg/dL ♀
Cociente Colesterol total/HDL-colesterol	< 4,5
Cociente LDL-colesterol/HDL-colesterol	< 3,5
TG	≤ 150 mg/dL

HDL, lipoproteínas de alta densidad; LDL, lipoproteínas de baja densidad; QM, quilomicrones; TG, triglicéridos; VLDL, lipoproteínas de muy baja densidad. Adaptado de García-Quismondo (2015).

En la rata se han definido niveles alterados de colesterol para colesterolemias superiores a 100 mg/dL [219]. Las hipercolesterolemias severas se definirían para niveles de este esteroide en plasma mayores de 200 mg/dL. Respecto a la trigliceridemia, los niveles normalidad se corresponden para triglicéridos menores de 100 mg/dL. También Sánchez-Muniz y Bastida [219] señalan como marcador de hipercolesterolemia, cocientes colesterol/triglicéridos >1, y de franca hipercolesterolemia para cocientes >2.

Hay que resaltar que la rata puede considerarse un animal HDL, ya que es la lipoproteína mayoritaria, siendo las LDL lipoproteínas que en condiciones de normalidad se encuentran en valores muy reducidos en la rata [219]. Este aspecto se debe a que en humanos la mayor parte de las VLDL, sino toda, es convertida en LDL [220], permaneciendo la apo-B 100 en el complejo lipoproteico durante su transformación. En la rata, la apo-B es aclarada de la circulación por las células hepáticas. La velocidad de desaparición es muy rápida y sólo el 10% de Apo-B aparece en IDL y posteriormente en LDL. Esto explicaría los bajos niveles de LDL que se encuentran en la rata y que contribuyen a que este animal sea resistente a la hipercolesterolemia y a las ECV. No obstante, se ha señalado la síntesis directa de LDL por el hígado en animales alimentados

con colesterol [221] y en pacientes hipercolesterolémicos [222], situación no descrita en animales normocolesterolémicos [223,224]. También es evidente que las ratas hipercolesterolémicas presentan un perfil lipoproteico diferente a aquellas normocolesterolémicas, consistente fundamentalmente en VLDL enriquecidas en colesterol (β -VLDL) [225-228].

Cuando los valores de LDL-colesterol superan el punto de corte (**Tabla 5**) [229], el tratamiento consiste en una dieta baja en AGS y moderada en AGM y AGP omega-3 y 6, ejercicio moderado, pérdida de peso, evitar el consumo de tabaco y alcohol, y en caso necesario el uso de fármacos hipolipemiantes. En el caso de hipertrigliceridemia, el tratamiento implica reducir el consumo de alcohol, hidratos de carbono refinados, especialmente fructosa, incrementar el consumo de AGP omega-3 y la reducción de peso [215].

Como puede intuirse por la bibliografía ya citada, nuestro grupo tiene amplia trayectoria en el estudio de lipoproteínas en rata y la inducción de hipercolesterolemia. Más recientemente nuestro grupo ha utilizado ratas condicionadas genéticamente como modelo experimental de síndrome metabólico y obesidad [11,211]. De forma similar que en humanos una rata fa-fa consumiendo dietas con alto contenido graso y en particular de ácidos grasos saturados desarrolla hipercolesterolemia que se agrava cuando se conjuntan con la adición de colesterol en la dieta [225,228]. La utilización de alimentos enriquecidos en ácidos grasos omega-3 (sardinas fritas) indujo potentes efectos hipocolesterolémiantes e hipotrigliceridémiantes en ratas Wistar [230]. También la rata es sensible al tratamiento con fibra dietética. Así Vázquez-Velasco y cols. [228] y González-Torres y cols. [225] encontraron efectos reductores muy marcados en la inducción hipercolesterolemia por la adición de glucomanano o glucomanano más espirulina a productos de la pesca o matrices cárnicas que se añadía a dietas enriquecidas en agentes hipercolesterolemiantes.

1.4.5 Factores que agravan el síndrome metabólico y riesgo cardiovascular

El síndrome metabólico genera numerosas alteraciones fisiológicas que pueden ser causa y/o consecuencia del mismo. A las principales patologías asociadas le siguen una serie de

cambios, tales como el estrés oxidativo, patologías hepáticas relacionadas con el metabolismo lipídico, inflamación, etc. Los factores asociados en la progresión del síndrome metabólico y la ECV serán explicados en detalle en los siguientes apartados.

1.4.5.1 Envejecimiento y edad

El envejecimiento es una de las causas más importantes relacionadas con las ECV y el síndrome metabólico. Con la edad ocurren alteraciones que agravan el riesgo cardiovascular [231]. Estos cambios se relacionan con modificaciones hormonales, enzimáticas, metabólicas que afectan al metabolismo lipoproteico. Así, los niveles de VLDL y LDL se incrementan reduciéndose los de HDL-colesterol [231]. Debido a mecanismos ya explicados, los niveles incrementados de triglicéridos pueden afectar a la resistencia a la insulina y al acúmulo de grasa en hígado, induciendo esteatohepatitis no alcohólica (NASH) [232]. También con la edad se reducen las capacidades endógenas antioxidantes que claramente repercuten en los apartados que se tratan a continuación [233,234].

En relación con el tema de tesis que nos atañe, comentaremos que la rata es un animal cuya edad se prolonga más allá de los 24 meses y que en esta Tesis se han empleado ratas de un año de vida. Algunos autores consideran que una rata de 1 año, tiene una edad equivalente a la de un humano de 60 años [235,236], por lo que consideramos que se trata de un buen modelo para explicar muchos aspectos relacionados con el envejecimiento y su implicación en la ECV y el síndrome metabólico.

1.4.5.2 Estrés oxidativo

Numerosos estudios han demostrado que las alteraciones producidas como consecuencia de la resistencia a la insulina y diabetes guardan estrecha relación con el estrés oxidativo [197]. Dentro de los mecanismos por los cuales la resistencia a la insulina induce estrés oxidativo pueden estar implicados:

- Aumento de oxidación de glucosa.
- Activación de la enzima aldosa reductasa y reducción de glucosa a sorbitol por inducción de la vía de polioles, que inhibe la respuesta antioxidante a nivel celular.

INTRODUCCIÓN

- Aumento de glicosilación no enzimática de proteínas, ya que su unión a receptores conduce a un aumento en la generación de ROS.
- Activación de la proteína quinasa C (PKC), por un descenso en la actividad de GAPDH aumenta las concentraciones de diglicéridos. Esto genera la activación de la NADPH-oxidasa, y por lo tanto la disminución de la relación NADPH/NADP⁺.
- Activación de la vía de las hexosaminas, que genera glucosamina-6-fosfato que inhibe a la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenasa, acoplada a la reducción de NADP⁺, lo que favorece aún más el descenso de la relación NADPH/NADP⁺.
- Incremento en la actividad del citocromo P450E1, que aumenta la generación de radicales libres en la cadena de transporte de electrones. [197,237,238].

Todas estas alteraciones conducen a un estado de estrés oxidativo crónico y están implicadas en la aparición de resistencia a la insulina, disfunción de las células β y desarrollo de diabetes y sus complicaciones micro y macro vasculares [237,239].

1.4.5.2.1 Especies reactivas de oxígeno

Los radicales libres son cualquier molécula o átomo que contiene uno o más electrones no apareados en su última capa de valencia, lo que les confiere una capacidad para iniciar reacciones de oxidación. Los radicales libres tienen una vida media corta y concentraciones bajas en estado estacionario [240]. Son producto de reacciones bioquímicas de óxido-reducción (REDOX) que ocurren como consecuencia del metabolismo celular normal (reacciones bioquímicas con el oxígeno o las que se generan en las vías de defensa antioxidante). En el organismo se han descrito los radicales del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), hidroxilo ($^{\cdot}OH$) y peroxilo (ROO^{\cdot}) [241-243].

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) incluyen al oxígeno (radical superóxido y radical hidroxilo), sin embargo existen otras especies que contienen oxígeno pero no presentan electrones desapareados, aunque tienen la capacidad de generar o actuar químicamente como ROS (p.e. peróxido de hidrógeno (H_2O_2), oxígeno singlete (atómico; 1S o 1D) y ácido hipocloroso ($HClO$) [244].

Los niveles de ROS en condiciones fisiológicas normales son lo suficientemente bajos para ser eliminados eficazmente por los mecanismos de defensa naturales de la célula. Sin embargo, existe una gran cantidad de compuestos y situaciones fisiológicas que pueden aumentar las ROS haciendo que las defensas celulares se desequilibren generando daño a nivel celular. Todas las macromoléculas del organismo tienen la capacidad de interactuar con las ROS (lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, e hidratos de carbono). No obstante, las reacciones que los AGI, que conforman las membranas celulares, llevan a cabo con estas especies son las más comunes. [244-246].

Los radicales libres y ROS son considerados pieza clave en el desarrollo de enfermedades degenerativas como la obesidad, ECV y DMT2. Además, se ha demostrado que la hipercolesterolemia incrementa la producción de radicales libres y mecanismos de inflamación relacionados [246,247].

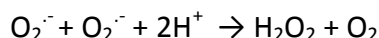
1.4.5.2 Mecanismos celulares de defensa antioxidante

Cuando los mecanismos endógenos de defensa no son suficientes, la proliferación de radicales libre da lugar a la oxidación de macromoléculas nucleófilas como enzimas, ADN y algunos componentes lipoproteicos de la membrana celular [248]. La peroxidación *in vivo* puede modificar las características de fluidez y permeabilidad de las diversas membranas biológicas y se relaciona con los fenómenos celulares tóxicos y de daño tisular [249]. Existen dos principales sistemas de defensa antioxidante, clasificados como:

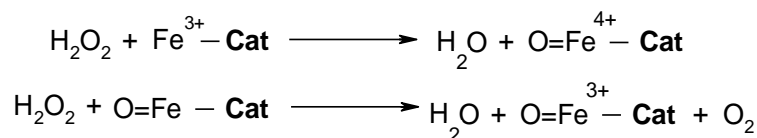
- *Sistema de defensa enzimático.* Las enzimas responsables a nivel celular de la desintoxicación de las ROS son:
 - *Superóxido dismutasa (SOD):* Es una metaloproteína encontrada principalmente en las mitocondrias y citosol. Existen dos isoenzimas de la SOD: la Cu/Zn-SOD, conocida como “eritrocupreína”, es un dímero de 33kDa de peso molecular que contiene dos átomos de Cu y dos de Zn que está localizada principalmente en el citosol. Y la Mn-SOD, el tetrámero con un peso molecular de 85 kDa que presenta de dos a cuatro átomos de Mn y se encuentra en la mitocondria.

INTRODUCCIÓN

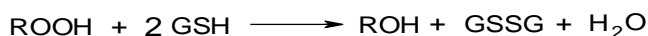
La principal función de ambas isoenzimas es reaccionar con los radicales superóxido que se producen durante la reducción enzimática del oxígeno, por diversas enzimas y sistemas enzimáticos. Durante la reacción una molécula de superóxido se oxida hasta O_2 molecular, mientras que la otra se reduce a H_2O_2 .



- *Catalasa (CAT)*: Se encuentra presente en el citoplasma, mitocondrias, peroxisomas y otros organelos celulares. Su función es catalizar dos tipos de reacciones con el objetivo de eliminar el peróxido de hidrógeno presente en la célula.



- *Glutation peroxidasa (GPx)*: Existen dos isoformas principales, la glutathion peroxidasa dependiente de selenio (GPx-Se), que se encuentra en el citoplasma y mitocondrias. Es una metaloproteína cuyo átomo metálico controla la actividad y síntesis de la propia proteína. Por otra parte, la glutathion peroxidasa no dependiente de selenio (GPx-no-Se), se encuentra en el citoplasma de las células, no contiene selenio, y su función principal es eliminar hidroperóxidos (ROOH), reduciéndolos a formas más estables como los hidróxidos (ROH), utilizando como sustrato reductor al glutathion reducido (GSH) que da lugar a glutathion oxidado (GSSG).



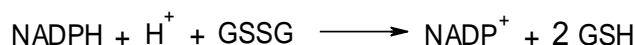
La GPX es específica para su donante de hidrógeno, GSH, pero no para el hidroperóxido. La falta de especificidad de acción sobre un sustrato aumenta la capacidad de acción de la GPx, pudiendo actuar además sobre el H_2O_2 o los hidroperóxidos orgánicos.

- *Glutation reductasa (GR)*: Es una flavoproteína presente en el citosol y mitocondrias de las células. Su función es catalizar la reducción del GSSG a dos

INTRODUCCIÓN

moléculas de GSH. Para que esta reacción se lleve a cabo necesita de un sustrato específico, el fosfato de Nicotinamina Adenina Dinucleótido (NADPH). La GR permite mantener los niveles de GSH necesarios para poder ser usados como sustratos reductores de la GPx.

El aumento de la relación entre GSSG/GSH puede ser tóxico para la célula, por lo tanto el buen funcionamiento del enzima es muy importante para el equilibrio redox.



- *Sistema de defensa no enzimático*: conformado por los componentes no enzimáticos del mecanismo endógeno celular, que actúan como sustrato/producto de las reacciones.
 - *Glutation reducido (GSH) y oxidado (GSSG)*: El glutatión es un tripéptido que se encuentra en el citoplasma y mitocondrias, contiene un grupo sulfhidrilo (-SH), lo que le hace esencial como cofactor en diversos sistemas enzimáticos [240]. Es sintetizado en mayor proporción por el hígado o incluso por las células desprovistas de núcleo, el eritrocito maduro [250]. Los niveles de glutatión pueden disminuir con la edad. Esto puede deberse a un incremento de la tasa de oxidación o una disminución del recambio de GSH e incremento de GSSG debido a una mayor utilización o degradación y/o por una menor biosíntesis [240].



- *Malondialdehído (MDA)*: Se considera un producto de reacción de peroxidación de determinados ácidos grasos poliinsaturados, principalmente a partir del ácido araquidónico. Los compuestos de bajo peso molecular, como el MDA, se absorben muy fácilmente en la pared intestinal. La enzima aldehído deshidrogenasa hepática es la principal responsable de la metabolización del MDA. Más que una sustancia de defensa, se considera un marcador del daño producido por la oxidación de ácidos grasos [249].
- Existen otras sustancias no enzimáticas que protegen al organismo en general y

INTRODUCCIÓN

que no se encuentran incorporadas dentro del sistema de defensa endógeno celular. Entre ellas, la vitamina C y E, el ácido úrico, los carotenoides, y la melatonina.

El esquema general que integra los sistemas endógenos de defensa antioxidante a nivel celular se presenta en la **Figura 11** [251].

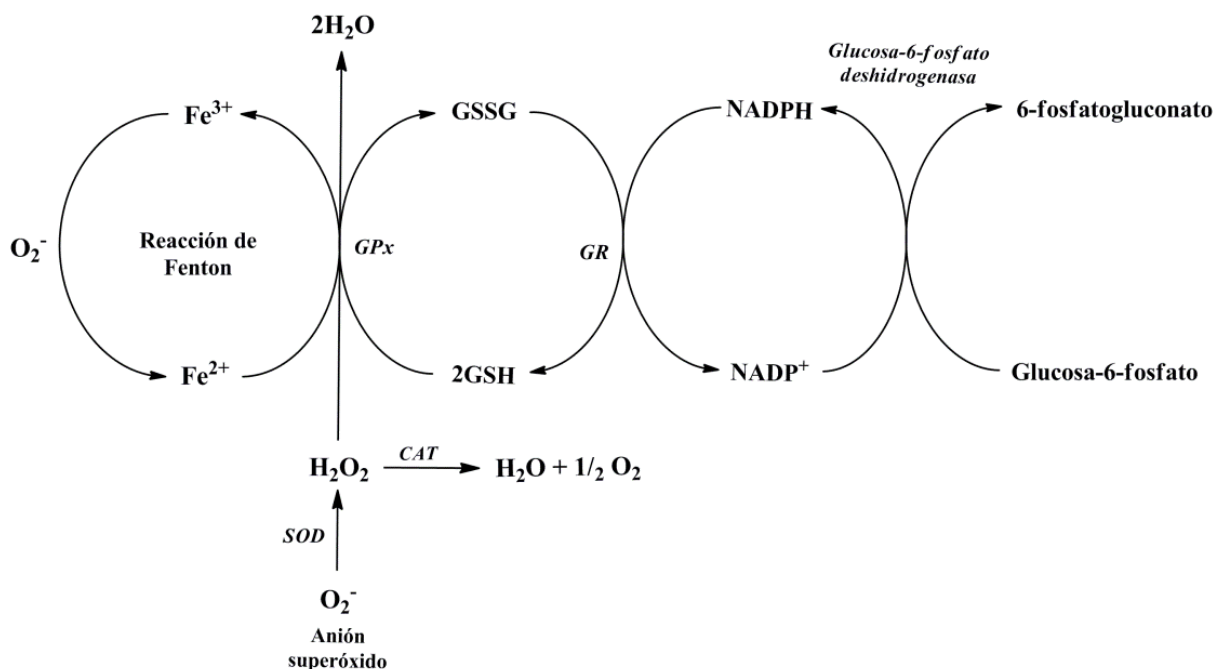


Figura 11. Esquema de integración de los sistemas antioxidantes. Adaptado de Schultz-Moreira (2014).

1.4.5.3 Metabolismo hepático

El hígado es el órgano que se considera como centro del equilibrio metabólico [193]. Los lípidos, la insulina y el glucagón juegan un papel clave en el control hepático de muchos procesos fisiológicos. Cuando se presenta un desequilibrio en cualquiera de los procesos, se propician alteraciones que tienen impacto en todo el organismo, como la resistencia a la insulina, DMT2 o hígado graso.

Los hepatocitos controlan los niveles de glucosa almacenándola o produciéndola según las necesidades del organismo. En el periodo postpandrial, los niveles elevados de glucosa en plasma activan la secreción de insulina por las células β pancreáticas. Mientras,

INTRODUCCIÓN

en el hígado, la unión de insulina a su receptor (IR) estimula, mediante fosforilación de la tirosina, a los IRS que a su vez activan la vía PI3K/AKT [193]. Así, la AKT fosforila e inhibe a la glucógeno sintasa quinasa 3 (GSK3) que a su vez, fosforila e inhibe a la glucógeno sintasa (GS), enzima implicada en la gluconeogénesis, lo que conduce al aumento de la síntesis de glucógeno e inhibición de la glucogenolisis [193,196]. La AKT además, fosforila al factor de transcripción *forhead box* (FOXO). Este factor de transcripción regula al activador de PPAR1 α (PGC-1 α) que a su vez estimula la expresión de enzimas gluconeogénicas como la glucosa-6-fosfatasa (G6Pasa) y la fosfo-enolpiruvato-carboxiquinasa (PEPCK) [193]. La inactivación de FOXO en respuesta a la insulina inhibe la gluconeogenesis y la síntesis neta de glucosa, procesos claves para mantener la homeostasis glucídica. Asimismo, la sobreexpresión de PEPCK produce hiperglucemia e hiperinsulinemia, y está relacionada con la DMT2, mientras que la supresión de esta enzima conduce a una hipoglucemia severa y cambios en el metabolismo lipoproteico [252].

La producción de insulina estimula la captación de glucosa a través del transportador de glucosa GLUT2 transformándose en G6P por acción de la enzima GK, lo que permite la entrada de glucosa en la glucolisis para obtener ATP [193]. En el hígado, la activación de la enzima GK por parte de la insulina es clave en el metabolismo glucídico, ya que participa en el control del flujo de glucosa en la célula. Durante la resistencia a la insulina se produce un bloqueo de la ruta de esta hormona. En la célula, la autofosforilación del IR es menos sensible, induciendo una mala regulación de proteínas de esta vía como los IRS-1 y-2, GSK3 y GS, lo cual provoca una disminución de la síntesis de glucógeno. Además, se produce un fallo en el control de la gluconeogénesis y la glucolisis causado por un desgaste de enzimas clave en estos procesos como las PEPCK y CK; se altera también, el flujo neto de glucosa al modificarse los niveles del GK y del transportador GLUT2 [193,253].

INTRODUCCIÓN

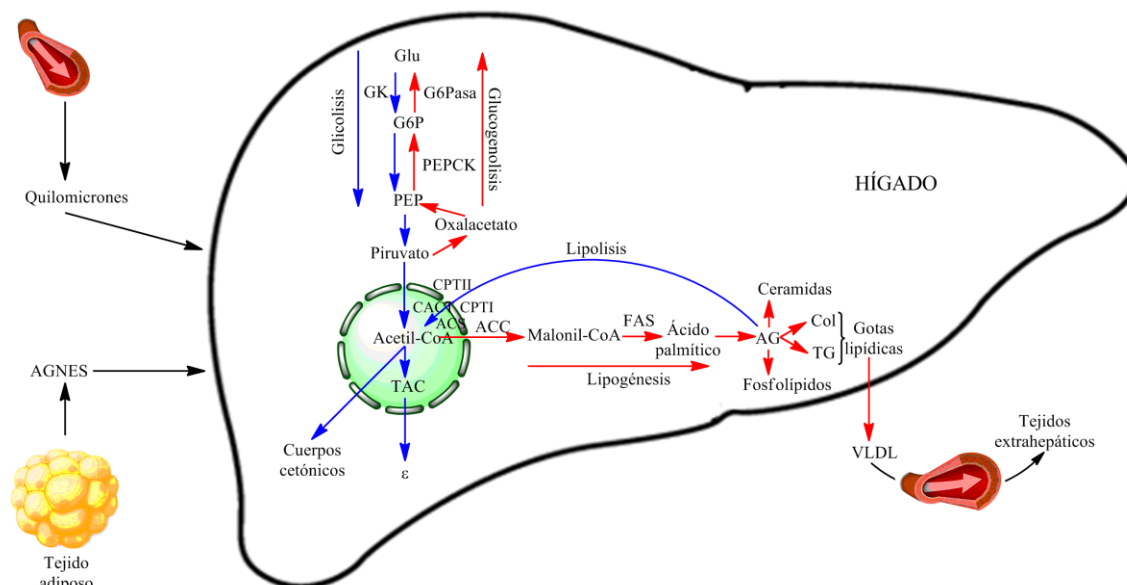


Figura 12. Principales rutas del metabolismo glucídico y lipídico en el hígado. Las flechas azules representan rutas catabólicas y flechas rojas rutas anabólicas. ACC, acetil-CoA carboxilasa; AG, ácidos grasos; AGNES, ácidos grasos no esterificados; Col, colesterol; CPTI y CPTII, carnitina palmitoiltransferasa 1 y 2; FAS, ácido graso sintetasa; G6P, glucosa-6-fosfato; Glu, glucosa; GK, glucoquinasa; PEP, ácido fosfoenolpirúvico; PEPCK, fosfoenolpiruvato carboxiquinasa; TG, triglicéridos. Adaptado de González-Torres (2016).

Los procesos de lipogénesis y su degradación (β -oxidación lipídica) se llevan a cabo en el hígado. Durante el periodo postprandial, la insulina estimula la biosíntesis de ácidos grasos en el hígado e inhibe su oxidación, lo cual produce un incremento en el almacenaje de ácidos grasos y TG. De todos los azúcares del metabolismo, la glucosa es la principal fuente para la síntesis de ácidos grasos. La acetil-CoA-carboxilasa (ACC) es un enzima limitante en la síntesis de ácidos grasos, transforma la acetil-CoA en malonil-CoA y se activa por varios estímulos, como el citrato (producto de la glucólisis). El producto de la reacción de la ACC, malonil-CoA, sirve de sustrato al enzima ácido graso sintetasa (FAS) para generar ácido palmítico (C16:0) a través del gasto de NADPH y diferentes elongasas y desaturasas que catalizan la síntesis de ácidos grasos [254,255]. Éstos son esterificados con glicerol para formar TG, o con colesterol para dar lugar a ésteres de colesterol, y se almacenan en el hígado como gotas de grasa y se exportan como VLDL [256]. La síntesis de ácidos grasos es una vía paralela al metabolismo de hidratos de carbono, ya que la

INTRODUCCIÓN

oxidación completa de la glucosa produce acetil-CoA, cuyo exceso se desvía hacia la síntesis de lípidos, conocida como *síntesis de novo* [255] (**Figura 12**) [11]. Además los ácidos grasos pueden incorporarse a los fosfolípidos para formar membranas biológicas, o pueden esterificarse con esfingosina para formar ceramidas [257].

Durante el ayuno, disminuyen los niveles de insulina y glucosa en la sangre, y se estimula el catabolismo de los ácidos grasos para obtener energía y producir cuerpos cetónicos. En el proceso de β -oxidación, los AGL se transportan a la matriz mitocondrial y se esterifican con la coenzima-A mediante un sistema de transporte que incluye diferentes proteínas como la carnitina palmitoiltransferasa 1 (CPT-1), y carnitina/acetil-carnitintranslocasa (CACT). Una vez en la mitocondria, el ácido graso acil-CoA se oxida para producir un incremento de energía. Además, en situaciones de ayuno se puede producir la síntesis de cuerpos cetónicos a partir de acil-CoA, que se secretan a la sangre para ser usados como fuente de energía alternativa a la glucosa en el cerebro y músculos [255].

El metabolismo lipídico en el hígado está modulado de manera destacada por la familia de la proteína de unión al elemento regulador del esterol (SREBP) y por el receptor activado de proliferación de los peroxisomas alfa (PPAR α) que regulan la expresión de enzimas lipogénicas o lipolíticas, respectivamente [252].

Los SREBPs son una familia de factores de transcripción implicados en la regulación del metabolismo de ácidos grasos y colesterol. La SREBP-1 es la principal proteína implicada en la expresión de enzimas lipogénicas. Su isoforma SREBP-1c se expresa en hígado y se sintetiza como precursor en el retículo endoplásmico. Ciertos estímulos, como la presencia de insulina, impulsan la rotura de la región N-terminal del precursor para generar la forma madura del SREBP-1c. En el núcleo celular, el SREBP1-c promueve la expresión de enzimas lipogénicas como ACC, FAS, Δ 9-desaturasa, Δ 6-desaturasa y Δ 5-desaturasa. Aunque SREBP-1c juega un papel clave en la lipogénesis, otros factores de transcripción están implicados en la regulación de este proceso, como el receptor X

INTRODUCCIÓN

hepático (LXR) y la proteína de unión al elemento de respuesta a hidratos de carbono (ChREBP) [254,255].

Por su parte, el PPAR- α se expresa mayoritariamente en el hígado y regula genes implicados en la oxidación mitocondrial, peroxisomal y microsomal de los ácidos grasos [258,259]. Es inhibido por la insulina mientras que el glucagón, los AGP y sus productos intermedios de oxidación, y los eicosanoides lo activan [255] (**Figura 13**)[11].

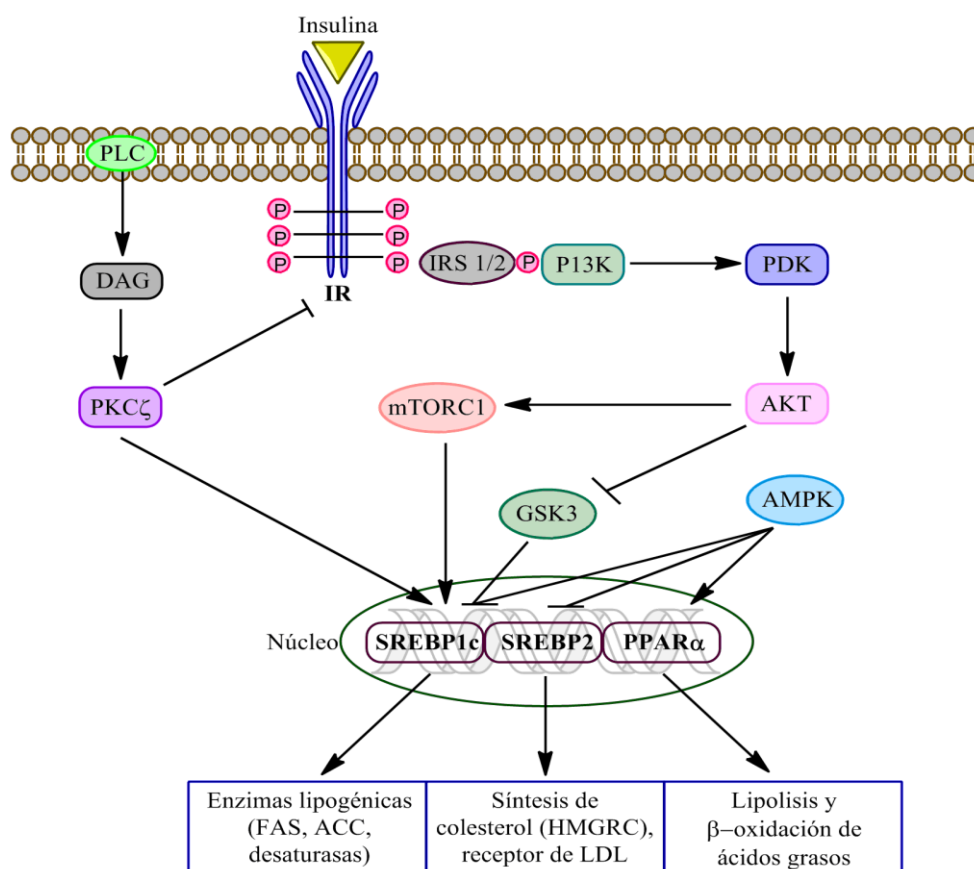


Figura 13. Ruta de señalización de la insulina y metabolismo lipídico en el hígado. Adaptado de González-Torres (2016).

La proteína quinasa activada por AMP' (AMPK) es un complejo enzimático que se activa con el aumento de relación AMP-ATP, ayuda al balance energético de la célula y el consumo de calorías. Interviene en el metabolismo lipídico en el hígado, activa la β -oxidación y disminuye la acumulación de lípidos por efecto de la fosforilación e inhibición de ACC. Además la AMPK inhibe a HMGCR, disminuyendo la síntesis de colesterol y al

SREBP-1c, lo que conduce a la inhibición de la lipogénesis. Por tal motivo es un elemento clave en el metabolismo, ya que la sobreexpresión del AMPK en el hígado incrementa la oxidación lipídica, disminuyendo los niveles de TG y por tanto, mejorando el perfil lipídico [260].

Durante la resistencia a la insulina, al contrario que en el metabolismo de hidratos de carbono, la insulina continúa ejerciendo su acción anabólica, de manera que la lipogénesis sigue activa y la lipólisis se inhibe [261]. Aunado a lo anterior, el flujo de ácidos grasos desde el tejido adiposo se incrementa, lo cual genera que se acumulen más ácidos grasos en el hígado, en forma de triglicéridos, con su posterior incremento en la secreción de VLDL. Esta alteración del metabolismo lipídico hepático durante la resistencia a la insulina provoca la inactivación de la AMPK y PPAR α , la activación de FAS y SREBP-1, y de vías de señalización de inflamación que favorecen la resistencia a la insulina. Además, el exceso AGL en el citoplasma contribuye a aumentar el estrés oxidativo agravando la situación [262,263].

1.4.5.3.1 Hígado graso no alcohólico

Una de las manifestaciones a nivel hepático del síndrome metabólico más comunes suele ser el hígado graso no alcohólico (NAFLD, de sus siglas *Non Alcoholic Fatty Liver Disease*), [264,265]. El NAFLD se define como la acumulación de grasa en forma de triglicéridos en más de un 5% de los hepatocitos en ausencia de inflamación o fibrosis y no asociada a un consumo elevado de alcohol (<30g en hombres y <20g en mujeres) [266].

Se relaciona con factores como la edad, sexo, dislipemia, DMT2, obesidad central, y algunos polimorfismos genéticos. La resistencia a la insulina se considera el nexo de unión entre el síndrome metabólico y el NAFLD, y un factor de riesgo en ECV. En los últimos años algunos estudios proponen que no sólo es el NAFLD el que precede al síndrome metabólico sino que es un factor determinante en su progresión [264,267-270].

La esteatohepatitis no alcohólica (NASH, de sus siglas *Non Alcoholic Steatohepatitis*), es la forma progresiva del NAFLD en la que además de esteatosis aparece

INTRODUCCIÓN

inflamación y balonización hepática que puede o no presentar fibrosis. La inflamación es consecuencia de la liberación de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α) o la interleuquina-6 (IL-6) provenientes del tejido adiposo o el propio hígado. La progresión de NAFLD a NASH sobreviene en un 20-25% de los pacientes con NAFLD, y generalmente de los pacientes con NASH aproximadamente un 20% desarrolla fibrosis y cirrosis. Fisiológicamente, el NAFLD se origina por un incremento de ácidos grasos libres (AGL) en pacientes que han desarrollado obesidad central y resistencia a la insulina [271-273].

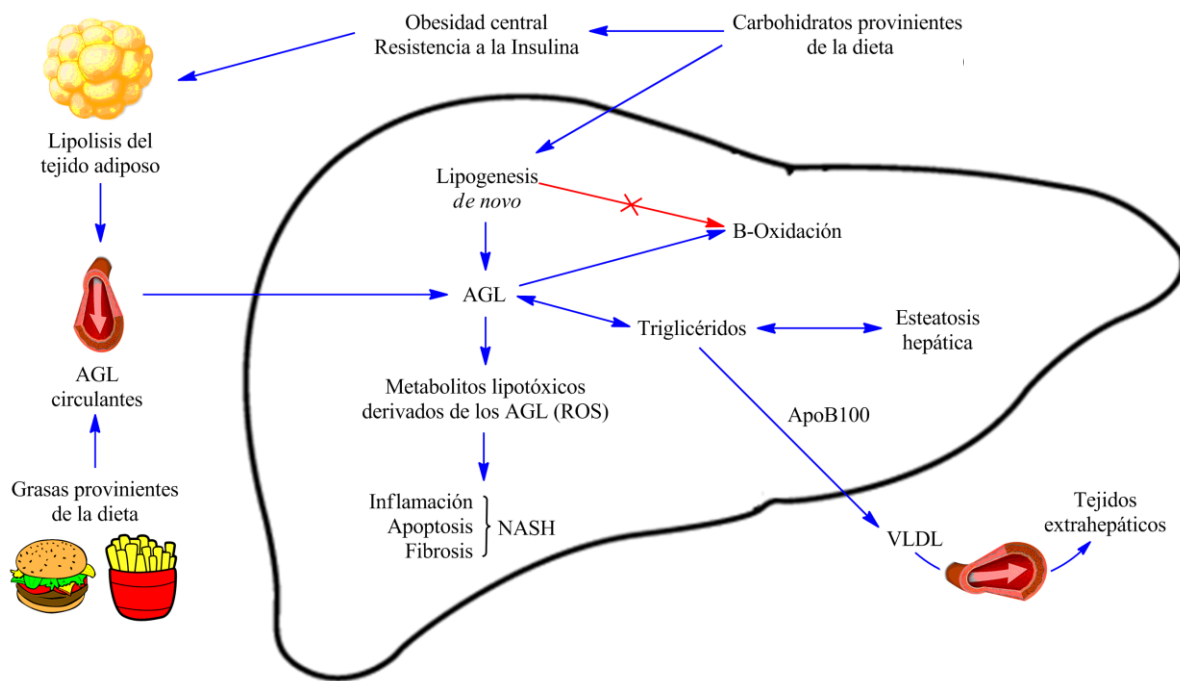


Figura 14. Esquema general del modelo de lipotoxicidad en el desarrollo de NASH. Adaptado de Perito y cols. (2013).

Los mecanismos implicados en la progresión del NAFLD a NASH no han sido completamente descritos. En 1998, Day y James [274] postularon la hipótesis del doble impacto, esta teoría, también conocida como modelo de lipotoxicidad, es la más extendida. El proceso descrito consiste en dos eventos o impactos. El primero, relacionado con la aparición de NAFLD. Cuando el organismo sufre de resistencia a la insulina, se produce un aumento de la actividad lipolítica en el tejido adiposo, y como consecuencia

INTRODUCCIÓN

de ello una mayor llegada de AGL al hígado, que provoca lipotoxicidad, disminución de la β -oxidación, y aumento en la acumulación de TG hepáticos [265].

El segundo evento provoca la progresión de NAFLD a NASH. Este paso se relaciona con la presencia de ROS provenientes de la síntesis de AGL, que a su vez generan un incremento en la peroxidación lipídica, disfunción mitocondrial, estrés oxidativo, apoptosis y la respuesta inflamatoria promovida por el daño de los hepatocitos [265,267] **(Figura 14)**.

Por último creemos que es importante definir a la lipotoxicidad como un mecanismo protector para evitar la acumulación de sustancias como AGS o colesterol que provocan daño celular, y no como un daño causado ante la acumulación de triglicéridos en el hígado, el cual no es un proceso perjudicial en sí mismo [265,275].

II. INTERÉS DEL ESTUDIO

III. HIPÓTESIS

II. INTERÉS DEL ESTUDIO

La relación entre alimentación incorrecta e incremento de la prevalencia de enfermedades crónicas y degenerativas es un hecho constatado en un número muy elevado de publicaciones [20,69,266,276-278]. Por ello, diferentes sociedades como la SENC [279] propusieron hace más de una década diferentes objetivos nutricionales y recomendaciones que ayudaran a mejorar la alimentación, y por ende la nutrición, de la población. A su vez entidades como la FDA e ILSI Europa regulan las alegaciones nutricionales y de salud de los alimentos [138,164], con la finalidad de asegurar una información adecuada y específica al consumidor, tanto de su composición como de los efectos funcionales que se alegan en el etiquetado de los mismos.

El consumo de carne, por su alto contenido en grasas saturadas, es un factor que generalmente va asociado con la influencia en el desarrollo de enfermedades degenerativas [18]. Es precisamente en este contexto donde surge la necesidad de ampliar las posibilidades en cuanto al desarrollo de productos cárnicos que funcionen como una estrategia emergente que ayude a paliar, al menos parcialmente, los efectos negativos de la alimentación actual. Dado que España es uno de los países con mayor consumo de productos cárnicos [18,20], la modificación de su composición a fin de obtener cárnicos funcionales, parece una herramienta útil para mejorar la calidad nutricional de la dieta de los españoles e incluso un método que ayude a reducir el riesgo futuro de enfermedades degenerativas.

Entre los ingredientes funcionales de interés por su actividad biológica y beneficios potenciales sobre la salud a incorporar en los productos cárnicos podrían destacarse los AGP, en particular los omega-3, y los compuestos fenólicos. Más recientemente ha emergido el interés por algunos micronutrientes como el silicio. El aceite de chía es la fuente natural más rica en ácido ALA, esta propiedad le confiere un elevado potencial para mejorar el perfil lipídico de aquellos alimentos a los que se incorpore dicho aceite. Por otro lado, debido a su función como antioxidante, el HxT es un polifenol ampliamente estudiado, tanto en los aceites vegetales en los que se encuentra previniendo la oxidación

de los AGP, como en los organismos vivos que lo consumen reforzando la defensa frente al estrés oxidativo. Por último aunque el silicio es un micronutriente esencial poco estudiado in vivo, ha demostrado ejercer funciones importantes, muchas de ellas relacionadas con las ECV y enfermedades neurodegenerativas [158,280].

La incorporación de estos tres ingredientes a carnes y sus derivados, ampliaría la disponibilidad de cárnicos funcionales con especial aplicación de su consumo en individuos con NAS o NAFLD y por tanto con capacidad antioxidante y perfil lipoproteico alterado.

III. HIPÓTESIS DEL ESTUDIO

El consumo de dietas ricas en grasa, AGS e hidratos de carbono refinados, enriquecidas o no con colesterol, en las que se incluye un reestructurado cárnico conteniendo como ingrediente funcional aceite de chía, HxT o silicio modifica el metabolismo lipídico, disminuye la lipemia, hiperglucemia y el estrés oxidativo hepático, y por tanto la incidencia de síndrome metabólico.

IV. OBJETIVOS

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Evaluar en un modelo experimental de NASH, la actividad funcional de los reformulados cárnicos enriquecidos con aceite de chía, HxT y silicio sobre diferentes marcadores del síndrome metabólico y metabolismo lipídico.

4.2 Objetivos específicos

1. En sistemas modelo cárnicos:

1.1 Determinar la estabilidad y capacidad antioxidante de emulsiones múltiples incorporadas dentro de una matriz cárnica.

2. En un modelo *in vivo*:

Conocer el impacto del consumo de las dietas experimentales conteniendo los cárnicos funcionales sobre:

2.1 El crecimiento y la ganancia de peso.

2.2 La glucemia, insulinemia y otros marcadores de resistencia a la insulina y/o DMT2.

2.3 La expresión génica, actividad y niveles de enzimas y otros biomarcadores relacionados con la actividad antioxidante en hígado.

2.4 La expresión génica y niveles de enzimas y otros biomarcadores del metabolismo lipídico en tejido hepático.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Materias primas

Para la elaboración de las emulsiones dobles, los sistemas modelo y los cárnicos enriquecidos de las dietas experimentales, se emplearon como ingredientes funcionales:

- Hidroxitirosol liofilizado (HxT; Seprox Biotech SL, Madrid, España), con un grado de pureza de 98% según el proveedor.
- Aceite de chía (Grupo Nutracéutico Chiasa SL, Valencia, España), conteniendo según el proveedor 18.5-21g/100g ácido linoleico, 57-65g/100g ALA, y 20-25g/100g de ácido palmítico, esteárico y oleico, dando un total de aproximadamente 85g/100g de AGP.
- Dióxido de silicio coloidal de grado alimentario (Ref. 113126, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania).

5.2 Preparación de emulsiones dobles *Water in Oil in Water* ($W_1/O/W_2$)

Las emulsiones $W_1/O/W_2$ (Tabla 6) se prepararon siguiendo el proceso en dos etapas descrito por Cofrades y cols., con ligeras modificaciones [28]. Se elaboraron dos emulsiones, una cuya fase interna acuosa (W_1) no contenía ningún ingrediente y otra a la que se le añadió HxT. En ambas se utilizó aceite de chía como fase oleosa. En la primera etapa del proceso de obtención se elaboró la emulsión primaria (W_1/O) con una proporción agua/aceite 20:80 en una Thermomix (Thermomix, Vorwerk, Alemania). Se adicionó sobre la base oleosa (aceite de chía) 6% de polirricinoleato de poliglicerol (PGPR), mezclando a 2800 rpm, durante 15 minutos a 50°C. Posteriormente, se adicionó lentamente la fase acuosa (20%) manteniendo la agitación a 3250 rpm. La mezcla resultante se enfrió a temperatura ambiente y se homogeneizó dos veces en un homogeneizador de alta presión (550/50 bar) (GEA Niro Soavi modelo Panda Plus 2000, Parma, Italia), obteniéndose así la emulsión primaria W_1/O . La segunda etapa consistió en adicionar la emulsión primaria (W_1/O) a la segunda fase acuosa (W_2 , 60%), manteniendo la mezcla a temperatura ambiente en la Thermomix (Vorwerk, Alemania) a 700 rpm durante

15 minutos. Posteriormente la mezcla se homogeniza dos veces más en el homogenizador de alta presión a 150/50 bar (**Tabla 6**).

Tabla 6. Formulación de las emulsiones dobles $W_1/O/W_2$

Tabla 1. Formulación de las emulsiones de tipo $W_1/O/W_2$				
		Fase interna acuosa (W_1)	Fase oleosa (O)	Fase externa acuosa (W_2)
$W_1/O/W_2$	Componentes	NaCl 0.1 M + SC 0.5% + agua destilada	Aceite de chía 94% + PGPR 6%	NaCl 0.1 M + SC 0.5%
	Proporción	20%	80%	60%
		40% (W_1/O)		
$W_1/O/W_2\text{-HxT}$	Componentes	NaCl 0.1 M + SC 0.5% + agua destilada (HxT 100 ppm)	Aceite de chía 94% + PGPR 6%	NaCl 0.1 M + SC 0.5%
	Proporción	20%	80%	60%
		40% (W_1/O)		

NaCl, cloruro sódico; SC, caseinato sódico; PGPR, polirricinoleato de poliglicerol; HxT, hidroxitirosol.

5.3 Preparación de sistemas modelo cárnicos

Se elaboraron cinco sistemas cárnicos (MB, del inglés *meat batter*) diferenciados por la fracción lipídica: a) un sistema control (MB-C) elaborado con grasa de cerdo; b) un sistema formulado sustituyendo la grasa animal con aceite de chía incorporado de forma líquida (sin encapsular) (MB-LO); c) un sistema, similar a MB-LO, pero con HxT (100 ppm) disuelto en agua (MB-LO-HxT); d) un sistema formulado sustituyendo la grasa de cerdo con las emulsiones dobles sin HxT (MB-WOW) y e) un sistema en el que se sustituyó la grasa de cerdo por las emulsiones dobles con HxT (MB-WOW-HxT). Todos los sistemas cárnicos se diseñaron para contener niveles iguales de grasa (11,4g/100g), utilizando cantidades similares de carne magra, y por tanto de contenido de proteína muscular de 15g/100g. La concentración de HxT se seleccionó de acuerdo a estudios previos donde se demostró la eficacia antioxidante en emulsiones de aceite en agua y sistemas modelo cárnicos [74].

La carne magra de cerdo se descongeló durante aproximadamente 18 horas a $2 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta una temperatura entre -1 y -2°C y se homogenizó durante 1 minuto en una

picadora-homogenizadora conectada a un baño de refrigeración (2°C) (Stephan Universal Machine UM5, Stephan u. Söhne GmbH and Co., Hameln, Alemania). A continuación se añadió la mitad de la grasa o de los sustituyentes de grasa (dependiendo de la formulación, W₁/O/W₂ o aceite de chía), cloruro sódico y agua con o sin HxT, y se mezclaron durante 1 minuto. Posteriormente, se añadió la mitad restante de los ingredientes y se homogenizó durante 1 minuto. La masa final obtenida se homogenizó a vacío durante 2 minutos. En todos los casos la temperatura final de la masa estuvo por debajo 12°C. La composición de los sistemas modelo cárnicos se muestra en la **Tabla 7**.

Tabla 7. Formulación de sistemas modelo cárnicos (g/100g)

Sistema modelo	Carne magra	Grasa de cerdo	Aceite de chía	W/O/W	W/O/W + HxT	Agua	NaCl	HxT
MB-C	70	9	-	-	-	19	2	-
MB-LO	70	-	8,4	-	-	19,6	2	-
MB-LO-HxT	70	-	8,4	-	-	19,6	2	100 ppm (en agua)
MB-WOW	70	-	-	28	-	-	2	-
MB-WOW-HxT	70	-	-	-	28	-	2	100 ppm (en la emulsión)

HxT, hidroxitirosol; WOW, emulsión doble; WOW-HxT, emulsión doble con hidroxitirosol; NaCl, cloruro sódico.

Mediante el empleo de una embutidora (Mainca, Barcelona, España), la masa cárnica resultante se introdujo en tripas de celulosa Nojax de 20 mm de diámetro (Viscase S.A., Bagnold Cedex, Francia) de una longitud aproximada de 30 cm. Las salchichas se sometieron a tratamiento térmico en un horno ahumador (modelo Unimatic 1000, Micro 40, Eller, Merano, Italia) hasta que el centro térmico del producto alcanzó 70°C. Las condiciones del tratamiento se establecieron previamente y la temperatura interna se monitorizó a lo largo del proceso por medio de termopares que se insertaron en el centro térmico de varias salchichas, los cuales se conectaron a un registrador de temperatura (DaqPro, Fourier Systems, Orland Park, Illinois, EEUU). Una vez se completó el tratamiento

térmico, las salchichas se atemperaron (30 minutos a temperatura ambiente) y guardaron en refrigeración ($2 \pm 2^{\circ}\text{C}$) durante toda la noche. Se calculó la pérdida de peso por cocción. Al día siguiente se envasaron a vacío (Cryovac® BB3050) y se almacenaron en refrigeración ($2 \pm 2^{\circ}\text{C}$) hasta su análisis.

5.4 Métodos analíticos *in vitro*

5.4.1 Morfología, estabilidad y tamaño de partícula de las emulsiones dobles

El tamaño de partícula ($D_{4,3}$) y la distribución de las gotas de la fase oleosa en las emulsiones dobles se determinaron con un analizador de tamaño de partículas de difracción de láser Malvern Mastersizer S (Malvern Instruments Ltd, Worcestershire, R.U.) equipado con un láser He-Ne ($\lambda = 633 \text{ nm}$) según el protocolo de Cofrades y cols. [28]. Los valores medios de tamaño y el porcentaje de distribución correspondiente a cada población observada fueron promedios de al menos tres mediciones. Se comprobó la morfología de las emulsiones dobles mediante el uso de un microscopio óptico convencional (Reichert, Munich, Alemania).

La separación gravitacional de las emulsiones (cremado) se registró durante el tiempo de almacenamiento a 4°C en términos de separación de fases y se expresó como porcentaje con respecto a la altura inicial de la muestra. Este parámetro se determinó por triplicado.

5.4.2 Capacidad antioxidante de emulsiones dobles y sistemas modelo cárnicos

5.4.2.1 Determinación de la actividad captadora de radicales libres mediante DPPH

El 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (DPPH) es un radical estable empleado para determinar la actividad antioxidante de una muestra. Se basa en el cambio en la absorbancia tras la reducción del DPPH con los componentes presentes debido a la captación de radicales libres.

Se determinó la capacidad antioxidante de las emulsiones y los sistemas cárnicos con la siguiente metodología. Para la elaboración del extracto se homogenizó 1 g de

muestra en 50 mL de metanol durante 30 segundos. El homogenizado se mantuvo en agitación a temperatura ambiente durante 30 minutos y se filtró a continuación con papel Whatman No. 1. Posteriormente se adicionaron 4 mL de una solución de DPPH en metanol (0.005 mg/mL) a 1 mL del extracto. La mezcla se dejó en oscuridad durante media hora a temperatura ambiente. Las absorbancias se miden a 515 nm por triplicado. Los resultados se expresan como el porcentaje de inhibición de DPPH por gramo de muestra [72].

5.4.2.2 Determinación de la capacidad reductora mediante ensayo FRAP

La capacidad reductora de las muestras se midió mediante el ensayo FRAP (ferric reducing antioxidant power). Dicho ensayo se basa en el aumento de la absorbancia de un complejo tripiridiltriazina con hierro TPTZ-Fe(III), el cual en presencia de agentes antioxidantes se reduce a su forma ferrosa Fe(II).

Para ello se obtuvieron extractos de las muestras homogenizando 1 o 2 g de muestra durante 30 segundos en 20 mL de una solución de ácido clorhídrico 16 mM en metanol/agua [1:1]. La mezcla se mantuvo en agitación durante una hora y posteriormente se centrifugó a 4500 rpm durante 10 minutos, recogiendo los sobrenadantes. Se realizó una segunda extracción de los precipitados con 20 mL de una solución acetona/agua [7:3] agitando durante una hora, y posterior centrifugación a 4500 rpm durante 10 minutos. Los dos sobrenadantes obtenidos se combinaron y se aforaron a un volumen final de 50 mL con una mezcla [1:1] de las soluciones metanol/agua y acetona/agua.

Para la obtención de valores del FRAP se mezclan 30 µL de extracto, 900 µL de reactivo FRAP y 90 µL de agua destilada. El reactivo FRAP se prepara diariamente y contenía 25 mL de tampón acetato [0,3 M] pH 3,6, 2,5 mL de TPTZ [10 mM] en ácido clorhídrico [40 mM] y 2,5 mL de cloruro de hierro III hexahidratado [20 mM]. Las absorbancias se miden a 595 nm y 37°C por triplicado. Para calcular la capacidad reductora de una muestra se tomó como referencia la recta de calibrado calculada para el

patrón de Fe(II) elaborada a partir de concentraciones conocidas de sulfato de hierro II heptahidratado. Los resultados se expresan como $\mu\text{mol Fe(II)}/\text{g}$ muestra [74].

5.4.2.3 Cuantificación de la peroxidación lipídica

El ensayo se basa en la capacidad que tiene el ácido tiobarbitúrico para reaccionar con algunos compuestos (sustancias reactivas) resultantes de la peroxidación lipídica, entre ellos el malondialdehído (MDA).

Los extractos se obtuvieron homogenizando 1 o 2 gramos de muestra (emulsiones y sistemas cárnicos) en 35 mL de ácido tricloroacético al 7,5% durante 30 segundos, la mezcla se centrifugó a 3000 rpm durante 2 minutos. Se adicionaron 5 mL del sobrenadante en 5 mL de una solución de ácido tiobarbitúrico [20 mM] y se dejó en oscuridad durante 20 horas a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción se realizó la medición de la absorbancia a 532 nm por triplicado. Para determinar la concentración final de MDA se tomó como referencia la recta de calibrado elaborada con 1,1,3,3-tetraetoxipropano y los resultados se expresan como mg MDA/kg de muestra [281].

5.5 Estudio *in vivo*

5.5.1 Preparación de dietas experimentales conteniendo cárnicos enriquecidos

Las dietas experimentales fueron diseñadas para presentar un alto contenido de grasas saturadas, colesterol, y energía. Se elaboraron cinco dietas, de las cuales cuatro fueron enriquecidas con inductores hipercolesterolemiantes (colesterol/ácido cólico):

- Dieta control (C), preparada a partir de la dieta semi-sintética modificada, sin colesterol añadido, a la que se incorpora el cárnico control sin enriquecer.
- Dieta control hipercolesterolemiantes (HC), elaborada como la dieta C pero en este caso parte del almidón de maíz fue reemplazado por 1.26% de colesterol y 0.25% de ácido cólico.

- Las dietas hipercolesterolemiantes con cárnicos enriquecidos con HxT, aceite de chía o silicio (HxT, CHIA, Si), similares a HC, pero que incorporan dentro del cárnico alguno de estos tres compuestos.

Para la formulación de las dietas experimentales, se mezclaron 217 g de cárnico enriquecido (RP) y 783 g de una formulación semi-sintética modificada (Panlab S.L., Barcelona, España, referencia U8959 versión 180) hasta homogeneidad total. Las dietas se calcularon para cubrir los requerimientos de micronutrientes a la concentración final (**Tabla 8**) [282].

Tabla 8. Composición de las dietas experimentales

Dieta	C	HC	HxT	Si	CHIA
Proteína (%)	21,6	21,6	21,6	21,6	21,6
Grasa (%)	16,9	16,6	16,6	16,6	16,6
Colesterol (g/kg)	0,14	16,3	16,3	16,3	16,3
AGS/AGM/AGP	2,36/2,46/1	2,36/2,46/1	2,36/2,46/1	2,36/2,46/1	0,27/0,33/1
Energía (MJ/kg) ¹	18,6	18,3	18,3	18,3	18,3
Ingredientes (g/kg)					
Almidón de maíz	226,1	211,0	211,0	211,0	211,0
Caseína	125,6	125,6	125,6	125,6	125,6
Maltodextrina	86,0	86,0	86,0	86,0	86,0
Sacarosa	217,8	217,8	217,8	217,8	217,8
Aceite de soja	44,0	44,0	44,0	44,0	44,0
Celulosa	31,4	31,4	31,4	31,4	31,4
Mezcla de minerales AIN-93MX ²	44,0	44,0	44,0	44,0	44,0
Mezcla de vitaminas AIN-93VX ³	6,3	6,3	6,3	6,3	6,3
L-Cisteína	1,9	1,9	1,9	1,9	1,9
Colesterol	0	12,6	12,6	12,6	12,6
Ácido cólico	0	2,5	2,5	2,5	2,5
Cárnico enriquecido	217,0	217,0	217,0	217,0	217,0

C, dieta control; HC, dieta hipercolesterolémica; HxT, dieta hipercolesterolémica con cárnico enriquecido con hidroxitirosol; Si, dieta hipercolesterolémica con cárnico enriquecido con silicio; CHIA, dieta hipercolesterolémica con cárnico enriquecido con aceite de chía. AGS, AGM, AGP, ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, respectivamente.

¹Datos calculados considerando como equivalente de energía para carbohidratos 16.73 kJ/g (4.0 kcal/g); grasa, 37.65 kJ/g (9.0 kcal/g); proteína 16.73 kJ/g (4.0 kcal/g).

^{2,3}Basado en estudios previos de Reeves y cols. [282]

La carne magra picada y la manteca de cerdo se adquirieron en una tienda local. Para la preparación de los RP de C y HC se homogenizaron 801,3 g de carne y 152,2 g de

manteca siguiendo un procedimiento similar al de la preparación de salchichas comerciales [74,283]. Para el grupo CHIA, se homogenizó el aceite de chía (152,2 g/kg) con la carne de cerdo magro y el resto de los componentes. En el caso de HxT (3.6 g/kg de materia fresca) y Si (1,3 g/kg de materia fresca), los componentes se homogenizaron previamente con la manteca de cerdo para evitar su dispersión y luego se mezclaron con el resto de los componentes. Las diferentes mezclas de RP se liofilizaron en un liofilizador LyoAlfa 10 (Telstar, Terrassa, España) (**Tabla 9**).

Tabla 9. Composición de los cárnicos enriquecidos (RP)

Componentes	C/HC	HxT	Si	CHIA
Proteína (%)	15,6	15,6	15,6	15,6
Grasa (%)	21,9	21,9	21,9	21,9
Agua (%)	62,5	62,5	62,5	62,5
Colesterol (g/kg)	0,65	0,65	0,65	0,65
AGS/AGM/AGP	3,99/4,32/1	3,99/4,32/1	3,99/4,32/1	0,3/0,37/1
<i>Ingredientes (g/kg)</i>				
Carne de cerdo magra	801,3	799,5	800,7	801,3
Manteca de cerdo	152,2	152,2	152,2	0,0
NaCl	5,1	5,1	5,1	5,1
Nitrito de sodio	1,2	1,2	1,2	1,2
STP	0,1	0,1	0,1	0,1
Dióxido de silicio ¹	0,0	0,0	1,3	0,0
Hidroxitirosol ²	0,0	3,6	0,0	0,0
Aceite de chía ³	0,0	0,0	0,0	152,2
Agua	40,1	38,3	39,4	40,1

C, dieta control; HC, dieta hipercolesterolémica; HxT, dieta hipercolesterolémica con cárnico enriquecido con hidroxitirosol; Si, dieta hipercolesterolémica con cárnico enriquecido con silicio; CHIA, dieta hipercolesterolémica con cárnico enriquecido con aceite de chía. AGS, AGM, AGP, ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados, respectivamente.

¹Dióxido de silicio de grado alimentario (Ref. 113126, Merck Millipore, Darmstadt, Alemania).

²Hidroxitirosol liofilizado (Seprox Biotech SL, Madrid, España).

³Aceite de chía (Grupo Nutraceutico Chiasa SL, Valencia, España).

5.5.2 Diseño experimental y obtención de muestras

Para los experimentos *in vivo* realizados en esta Tesis Doctoral se utilizaron 30 ratas Wistar macho (Harlan Laboratories Models, SL., Barcelona, España). Los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas ($22,3 \pm 1,8^{\circ}\text{C}$ y ciclo de luz-oscuridad de 12 h). Las ratas fueron alimentadas con pellets comerciales (Panlab, Barcelona, España) durante el periodo de adaptación a las condiciones ambientales. Cuando las ratas tenían un año de

edad y pesaban aproximadamente 500 g, se distribuyeron en cinco grupos de seis animales cada uno y se alimentaron diariamente con las dietas experimentales teniendo agua *ad libitum* durante ocho semanas. El consumo de alimento se controló diariamente mientras que el peso corporal una vez por semana.

Al final del periodo experimental, tras un periodo de ayuno de 12 horas, las ratas fueron anestesiadas con isoflurano (5%) y eutanasia por exanguinación con punción cardiaca. La sangre se recogió con jeringa heparinizada y el plasma se separó mediante centrifugación a 2000g durante 10 minutos. Se extrajo el hígado, el cual una vez lavado con solución salina, pesado, y separado en distintas porciones se ultracongeló en nitrógeno líquido y se mantuvo a -80°C hasta el momento del análisis.

Todos los experimentos se realizaron conforme a la Directiva 86/609/CEE, del 24 de noviembre de 1986 (modificada por la Directiva 2003/65/CEE, del 22 de julio de 2003), relativa a la protección de los animales en investigación científica. Este estudio fue aprobado por el Comité Asesor de Ciencia y Tecnología (proyecto AGL 2011-29644-C02-02), y por el Comité de Ética de la Universidad Complutense de Madrid.

5.5.3 Métodos analíticos *in vivo*

5.5.3.1 Extracción de lípidos hepáticos

El contenido de grasa total en el hígado se determinó gravimétricamente, después de evaporar a sequedad en rotavapor el extracto clorofórmico obtenido mediante una ligera modificación del método de Folch *y cols.* [284]. Aproximadamente 1 g de hígado se homogenizó con una mezcla cloroformo:metanol (2:1 v/v) en ultraturrax (IKA T-18, Staufen, Alemania), seguido de una segunda extracción del sólido remanente, según el protocolo de Olivero-David [285] que se muestra en la **Figura 15**.

MATERIAL Y MÉTODOS

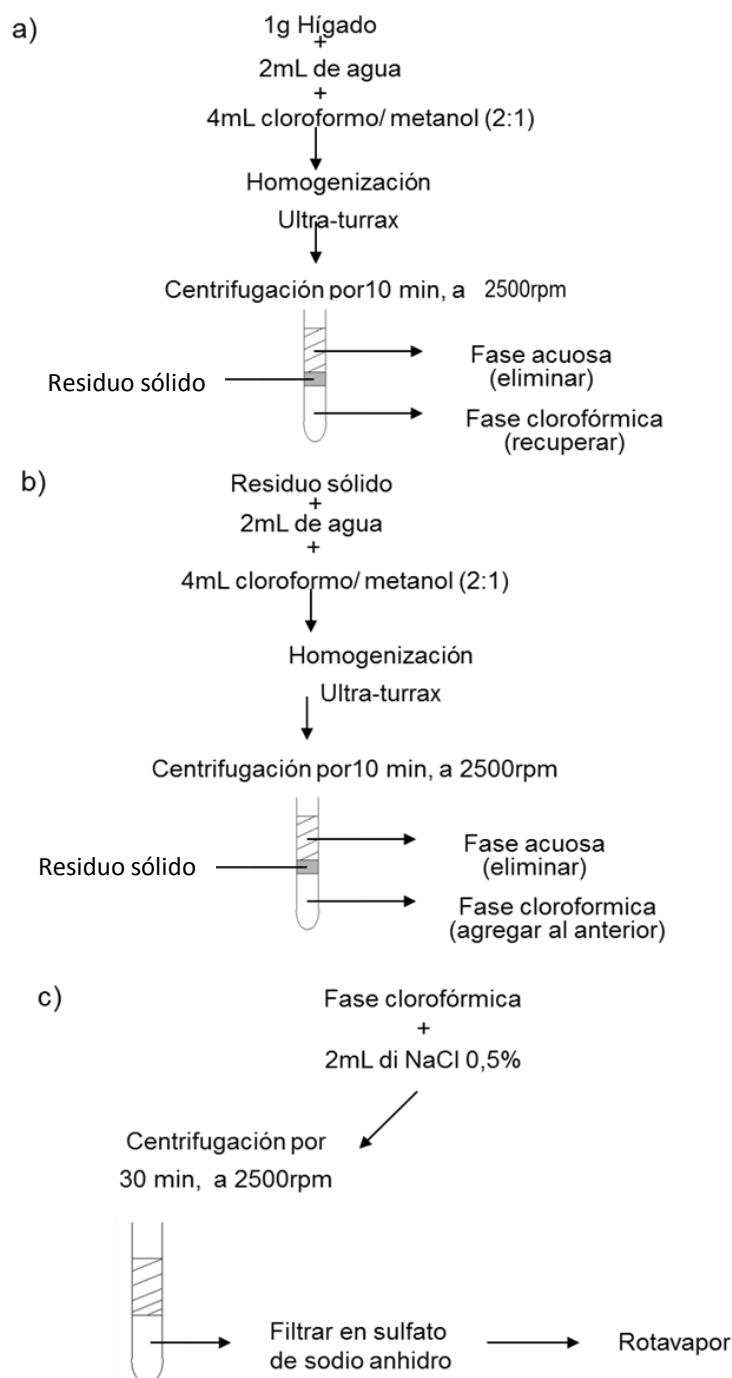


Figura 15. Protocolo de extracción de lípidos hepáticos. Adaptado de Olivero-David [285].

5.5.3.2 Determinación de parámetros plasmáticos

Todas las determinaciones de proteínas y lípidos en plasma, lipoproteínas y extractos hepáticos se realizaron a través de kits comerciales siguiendo las instrucciones del

fabricante. Los extractos de tejido empleados en las determinaciones bioquímicas y enzimáticas se obtuvieron homogenizando 100 mg de tejido en 1 mL de tampón fosfato (pH 7,4), posteriormente centrifugando a 10000rpm durante 10 minutos y 4°C, los sobrenadantes fueron recogidos y conservados en refrigeración hasta el momento del análisis.

- *Glucosa*: Los niveles en plasma se determinaron con el kit comercial GLUCOSE-TR (Spinreact S.A., Sant Esteve de Bas, Girona, España). El método consiste en la reacción de la glucosa oxidasa (GOD) que cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno (H_2O_2) resultante se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol-ampirona, en presencia de peroxidasa (POD). La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de glucosa presente en la muestra ensayada.
- *Colesterol*: Los niveles en plasma y extractos hepáticos se determinaron con el kit comercial CHOLESTEROL-LQ (Spinreact S.A., Sant Esteve de Bas, Girona, España). El colesterol presente en la muestra (esterificado más libre) origina tras una serie de reacciones acopladas donde se incluyen colesterol esterasa (CHE), colesterol oxidasa (CHOD), peroxidasa (POD) y la formación de un compuesto coloreado, la quinonimina. La intensidad del color formado es proporcional a la concentración de colesterol presente en la muestra ensayada.
- *Triglicéridos*: Los niveles en plasma y extractos hepáticos se determinaron con el kit comercial TRIGLYCERIDES-LQ (Spinreact S.A., Sant Esteve de Bas, Girona, España). Los triglicéridos incubados con lipoprotein-lipasa (LPL) liberan glicerol y ácidos grasos libres. El glicerol es fosforilado por la enzima glicerolfosfato deshidrogenasa (GPO) y ATP en presencia de glicerol quinasa (GK) originando glicerol-3-fosfato (G3P) y adenosina-5-difosfato (ADP). El G3P es entonces convertido a dihidroxiacetona fosfato (DAP) y peróxido de hidrogeno (H_2O_2) por la enzima GPO. Al final, el peróxido de hidrogeno (H_2O_2) reacciona con 4-aminofenazona (4-AF) y *p*-clorofenol, reacción catalizada por la peroxidasa (POD) dando una coloración roja.

- *Fosfolípidos*: Los niveles en plasma se determinaron con el kit comercial PHOSPHOLIPIDS CHO-POD (Spinreact S.A., Sant Esteve de Bas, Girona, España). Los fosfolípidos son hidrolizados por la enzima fosfolipasa D, y la colina liberada es secuencialmente oxidada por la colina oxidasa (CHO) a betaína, con la simultánea producción de peróxido de hidrógeno. En presencia de peroxidasa (POD) el peróxido de hidrógeno acopla oxidativamente a la 4-aminofenazona (4-AF) y al diclorofenol formando una quinonamina coloreada.
- *Proteínas*: Los niveles de proteínas en los extractos y en las lipoproteínas se midieron por triplicado utilizando el método Bradford [286]. Las lecturas se realizaron después de incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos, en un espectrofotómetro a 595nm. Las absorbancias se extrapolaron a una curva de calibrado obtenida con soluciones de albúmina bovina.
- Se emplearon kits comerciales tipo ELISA para cuantificar los niveles en plasma de *insulina* (Mercodia, Ref. 10-1250-01), *leptina* (CUSABIO, CSB-E07433r), y *adiponectina* (CUSABIO, CSB-E07271r), siguiendo las instrucciones del fabricante.
- *Ácidos grasos libres*: En plasma y extractos de tejido hepático se determinó la concentración de ácidos grasos libres mediante el test de ELISA (YH Bioserch Laboratory, YHB0446Ra) siguiendo las instrucciones del fabricante.
- *Índice de resistencia a la insulina*: Para su cálculo se utilizó el HOMA (*Homeostasis Model Assessment*), el cual establece la relación entre la glucemia basal y los niveles de insulina, evaluando el balance entre la producción hepática de glucosa y la secreción de insulina. El cálculo se obtiene con la siguiente formula:

$$\text{HOMA}_{\text{IR}} = \text{insulina en ayunas [mUI/L]} \times \text{glucosa en ayunas [mmol/L]} / 22,5.$$
- *Arilesterasa*: Una de las actividades más importantes de la enzima paraoxonasa-1 (PON1) es la actividad arilesterasa (AE) [287]. Esta enzima cataliza la formación de fenol a partir de acetato de fenilo, habiéndose relacionado las modificaciones en su actividad con cambios en la capacidad antioxidante de las HDL [288-290].
 La actividad AE en el plasma de rata se midió de acuerdo al método de Nus y cols. [289,290], tras modificar la composición del tampón mimético del suero, como

señalan estos mismos autores, para hacerlo adecuado a su medida en ratas. Se utilizaron blancos sin plasma para corregir la hidrólisis espontánea de fenilacetato que tiene lugar en el tampón. Una unidad de AE se define como la formación de 1 mmol de fenol/min a 37°C.

- *Aislamiento de lipoproteínas*: Las fracciones lipoproteicas VLDL, IDL+LDL y HDL, se separaron a partir de 2mL de plasma mediante ultracentrifugación en gradiente salino de acuerdo al protocolo descrito por Terpstra y cols. [291] con ligeras modificaciones según describen Olivero-David y cols. [226]. Para ello se empleó una ultracentrífuga Beckman L8-70M, con rotor SW-40.1 (Beckman, Palo Alto, California). Las muestras de plasma fueron separadas en un cortatubo Beckman, después de marcar los tubos transparentes de nitrato de celulosa, considerando el intervalo de densidad referido para la rata de VLDL ($\rho_{20} < 1,0063$ g/mL), LDL ($1,0063 < \rho_{20} < 1,057$ g/mL) y HDL ($1,057$ g/mL $< \rho_{20} < 1,21$ g/mL).

5.5.3.3 Determinación de marcadores de oxidación hepática

- *Catalasa (CAT)*: La actividad de la CAT fue determinada según el método descrito por Aebi [292], el cual se basa en la reacción de la descomposición del peróxido de hidrogeno por acción enzimática. La técnica consiste en medir la descomposición del sustrato, H_2O_2 , mediante el descenso de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro (Uvikon 930, Kontron Instruments S.A., Madrid, España) al añadir la muestra. Las lecturas se realizaron cada 30 segundos durante 10 minutos a 37°C. Los resultados se expresan en UI/mg de proteína.
- *Superóxido dismutasa (SOD)*: La actividad de la SOD se determinó según el método del NBT (azul de tetrazolio) con ligeras modificaciones [293]. Este método se basa en la generación de radical superóxido ($\cdot O_2^-$) mediante la auto-oxidación del clorhidrato de hidroxilamina (CH). En el medio de reacción, el NBT es reducido a nitrito y éste reacciona con EDTA (sal disódica dihidratada del ácido etilendiaminotetraacético) formando un complejo coloreado que se cuantifica midiendo la absorbancia a 560 nm

cada minuto durante 10 minutos a 37°C (SPECTROstar nano BMG Labtech, Ortenberg, Alemania). Los resultados se expresan en UI/mg de proteína.

- *Glutation reducido (GSH) y oxidado (GSSG)*: Los niveles de GSH y GSSG fueron determinados siguiendo el método de Hissin y Hilf [294], utilizando como sonda fluorescente el *o*-ftaldialdehído (OPT). El GSH y GSSG forman un compuesto fluorescente con el OPT que se mide a las longitudes de onda de excitación de 350 nm y de emisión de 420 nm (el pH óptimo de reacción para GSH es 8 y para GSSG, 12). A pH mayor de 8 el GSH se transforma en GSSG, por lo que es necesario bloquear la forma reducida con N-etilmaleimida (NEM).

Para la determinación del GSH se adiciona a la muestra OPT y se mide la fluorescencia a 350 nm y 420 nm tras 15 minutos de incubación (LS50 Perkin–Elmer, Baconfield, UK). En el caso del GSSG se añade a la muestra NEM para bloquear el GSH. Tras incubar 30 minutos a temperatura ambiente, se adiciona hidróxido de sodio (NaOH) 0,1 N para alcalinizar el medio y OPT, midiendo la fluorescencia de igual forma que para el GSH.

Las concentraciones se calculan mediante curvas de calibrado a concentraciones conocidas de GSH y GSSG. Los resultados se expresan como µg de glutathione/mg de proteína. Paralelamente se calcula el índice redox (IR), parámetro indicativo del estado de oxidación del tejido, en función a la siguiente ecuación: $IR = GSSG / (GSH + GSSG)$.

- *Peroxidación lipídica*: Para determinar la peroxidación lipídica en hígado, se utilizó la técnica del TBARS descrita en el apartado 5.4.2.3. Previamente se homogenizaron 50mg de tejido en tampón fosfato 50mM, seguido de un proceso de sonicación por 10 segundos con repeticiones de 3 veces a intervalos de 20 segundos entre ellas. Se centrifugan los homogenizados durante 20 min a 5100 rpm a 4°C, y los sobrenadantes se recogen para utilizarlos según el protocolo descrito.

Las actividades enzimáticas fueron estandarizadas a la concentración de proteínas de los homogenados del tejido hepático, determinadas mediante el método de Bradford [286].

5.5.3.4 Detección y cuantificación de proteínas mediante Western-blot

Se obtuvieron extractos proteicos totales y de fracciones subcelulares (citoplasmáticas, mitocondriales y nucleares) a partir del tejido hepático. Posteriormente se separaron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida/dodecil sulfato de sodio al 10-15% (SDS-PAGE). Los geles se transfirieron a continuación sobre membranas de PVDF *Amersham Hybond-P* (GE Health-care, Buckinghamshire, UK) y se incubaron con sus correspondientes anticuerpos (**Tabla 10**).

Tabla 10. Anticuerpos primarios empleados en Western-blot

Proteína		Referencia
<i>ACC</i>	Acetil coenzima A carboxilasa	sc-30212 ^a
<i>AMPK</i>	Proteína quinasa activada por AMP	sc-25792 ^a
<i>CAT</i>	Catalasa	C0979 ^b
<i>ChREBP</i>	Proteína de unión al elemento de respuesta de carbohidratos	sc-33764 ^a
<i>CPT-1a</i>	Carnitina palmitoiltransferasa 1a	sc-393070 ^a
<i>FASN</i>	Ácido graso sintetasa	sc-48357 ^a
<i>GPx</i>	Glutation peroxidasa	Ab59546 ^c
<i>GR</i>	Glutation reductasa	sc-32886 ^a
<i>pACC</i>	ACC fosforilada	sc-30447-R ^a
<i>pAMPK</i>	AMPK fosforilada	sc-33524 ^a
<i>PPARα</i>	Receptor activado por proliferador de peroxisoma alfa	sc-1985 ^a
<i>PPARγ</i>	Receptor activado por proliferador de peroxisoma gamma	sc-1984 ^a
<i>SOD</i>	Superóxido dismutasa	S2147 ^b
<i>SREBP-1c</i>	Proteína de unión al elemento regulador del estero 1c	sc-366 ^a
<i>TBP</i>	Proteína de unión a TATA	sc-273 ^a
<i>TOMM20</i>	Translocasa de la membrana mitocondrial externa 20	sc-11415 ^a
<i>β-Act</i>	Beta actina	A2228 ^b sc-47778 ^a

^a Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Texas, EEUU).

^b Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EEUU).

^c Abcam (Cambridge, Reino Unido).

Los anticuerpos β -Act, TBP y TOMM20 se utilizaron como controles de carga para los homogenados citoplasmáticos, nucleares, y mitocondriales respectivamente. Las membranas se revelaron mediante quimioluminiscencia usando el reactivo de detección *Amersham ECL Plus Western Blotting Detection Reagent* (GE Health-care, Buckinghamshire, Reino Unido) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

5.5.3.5 Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qRT-PCR)

El RNA fue aislado a partir de 100 mg de tejido hepático usando TRI-reagent® (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, Missouri, EEUU), y posteriormente tratado con el kit *DNase I RNase-free* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU) para eliminar posibles contaminaciones con DNA genómico. La cantidad y pureza del RNA extraído se determinó mediante la medida de la absorbancia a 260, 280 y 310 nm (SPECTROstar nano BMG Labtech, Ortenberg, Alemania), y mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. El DNA complementario (cDNA) se sintetizó a partir de 1 µg de RNA con el kit *Revert Aid H Minus cDNA synthesis* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU).

Tabla 11. Secuencias de los oligonucleótidos usados en la qRT-PCR

Gen	Secuencia	Número de acceso
<i>Adipor2</i>	<i>Forward</i> TTGTCATCTGTGTGCTGGGC <i>Reverse</i> GAACACTCCTGCTCTGACCC	NM_001037979.1
<i>Cat</i>	<i>Forward</i> ATCAGGGATGCCATGTTGTT <i>Reverse</i> GGGTCCTTCAGGTGAGTTTG	NM_012520.2
<i>Cu/Zn-SOD</i>	<i>Forward</i> CTTCGAGCAGAAGGCAAGCG <i>Reverse</i> GACATGGAACCCATGCTCGC	NM_017050.1
<i>GR</i>	<i>Forward</i> GGTGACTATGACAACATCCC <i>Reverse</i> GCTTCATCTTCAGTGAGCCC	NM_053906.2
<i>Insr</i>	<i>Forward</i> ACCTTCTCTGATGAACGCCG <i>Reverse</i> GGAACGGAAGGATTGGTGGC	NM_017071.2
<i>Lepr OB-Rb</i>	<i>Forward</i> CAACACTGAAGGGAAGACGC <i>Reverse</i> CCAGTTTACACCTAGTTGGCG	NM_012596.1
<i>Ldlr</i>	<i>Forward</i> CTGTATTCACGGTAGCCGCC <i>Reverse</i> TGGGTACATTGATGCAGCC	NM_175762.2
<i>Mn-SOD</i>	<i>Forward</i> ACTGAAGTTCAATGGCGGG <i>Reverse</i> TCCAGCAACTCTCCTTTGGG	NM_017051.2
<i>Nrf2</i>	<i>Forward</i> TTGTAGATGACCATGAGTCGC <i>Reverse</i> GAGCTATCGAGTGACTGAGCC	NM_031789.2
<i>β-Act</i>	<i>Forward</i> CGGTCAGGTCATCACTATCGG <i>Reverse</i> TCCATACCCAGGAAGGAAGGC	NM_031144.3

La cuantificación relativa del mRNA de los distintos genes se realizó monitoreando la reacción de polimerización en un termociclador acoplado a un detector de fluorescencia *LightCycler Real Time PCR Detection System* (Roche diagnostics, Indianapolis, Indiana, EEUU), utilizando como marcador la sonda fluorescente *SYBR®Green* (Biotools, Madrid,

España). Los niveles de expresión génica fueron normalizados respecto a los valores del control endógeno β -actina y los resultados se expresaron en función a los valores del ciclo umbral o de *threshold* (Ct) relativizados al control utilizando el método del $2^{-\Delta\Delta C_t}$ propuesto por Livak y Schmittgen [295].

Los parámetros de PCR utilizados fueron los siguientes: preincubación a 95°C durante 10 min, seguido por 45 ciclos que constan de desnaturalización 10 segundos a 95°C, hibridación con una temperatura de anillamiento de entre 55 y 70°C dependiendo del oligonucleótido, y extensión 15 segundos a 72°C, seguido finalmente de un ciclo de enfriamiento a 40°C durante 30 segundos. Las secuencias de los oligonucleótidos empleados en cada experimento se muestran en la **Tabla 11**.

5.5.3.6 Análisis histológico de hígado

Las muestras del lóbulo lateral derecho del hígado fueron fijadas inicialmente en formaldehído al 10%, e incluidas en un bloque de parafina. Se obtuvieron secciones del lóbulo de 4 μ m de espesor en un micrótomos. Los cortes se tiñeron con hematoxilina y eosina y se observaron a una ampliación de 4x, 10x, y 20x. La evaluación histológica para valorar la actividad NAFLD (NAS), se calculó como la suma de las puntuaciones de esteatosis (0-3), inflamación lobular (0-3) y balonización de hepatocitos (0-2). El índice NAS se puntuó de 0 a 5, en donde 0-2 = ausencia de NASH, 3-4 = límite entre la ausencia y desarrollo de NASH, y 5 = presencia definitiva de NASH [296]. Los índices de esteatosis, inflamación y balonización se evaluaron de acuerdo a estudios previos [297].

5.6 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico se empleó el programa SPSS (versión 22). Los resultados se expresaron como los valores medios con su desviación estándar. Se aceptaron diferencias significativas entre grupos para probabilidades $p < 0.05$.

Se aplicó el test de análisis de varianza (ANOVA) de una vía para analizar los efectos sobre los resultados entre grupos, seguido de la corrección *post-hoc* para múltiples comparaciones de Bonferroni o el de T2 de Tamhane cuando se asumieron

MATERIAL Y MÉTODOS

varianzas diferentes. El efecto del consumo de colesterol (dieta HC vs. C) se estudió mediante el test de la t de Student. Para la comparación de variables cualitativas o semicuantitativas (p.e. en el estudio histológico) se empleó el test de Mann-Whitney, evaluado por el método de la significación exacta bilateral de Monte Carlo. Por último, para conocer las posibles relaciones lineales entre parámetros de todos los experimentos, se empleó el test de correlaciones producto-momento de Pearson.

VI. RESULTADOS

VI. RESULTADOS

6.1 Publicación No 1

Oxidative stability of meat systems made with $W_1/O/W_2$ emulsions prepared with hydroxytyrosol and chia oil as lipid phase

Cofrades S., Santos-López J. A., Freire M., Benedí J., Sánchez-Muniz F. J., Jiménez-Colmenero F.

LWT - Food Science and Technology, 59 (2014), 941-947

InCites Journal Citation Reports (2015). Índice de Impacto: 2.711 (24/125, Q1, Food Science & Technology)

Resumen: El objetivo de este trabajo fue evaluar la estabilidad oxidativa de sistemas modelo cárnicos (MB) elaborados con un perfil lipídico mejorado, en los cuales la grasa de cerdo fue reemplazada por una emulsión doble (DE, $W_1/O/W_2$) preparada con hidroxitirosol (HxT) dentro de una fase acuosa interna y aceite de chía como fase lipídica. Se analizaron las características físicas, así como su estabilidad oxidativa tanto de DE como de MS durante el periodo de almacenamiento. Las DE demostraron buena estabilidad y una estructura homogénea. Las DE que contenían HxT mostraron una buena capacidad antioxidante en los primeros días de almacenamiento. La estabilidad oxidativa de cada una de las diferentes MB estudiadas puede interpretarse en términos de varios factores asociados con la composición y las condiciones de procesamiento. La presencia de aceite de chía, con el consiguiente aumento en el nivel de insaturación de ácidos grasos que contiene, promueve la peroxidación lipídica en masas de carne cocidas, pero también parece proporcionar algunos compuestos que pueden ayudar a proteger contra la oxidación (incremento de la actividad captadora de radicales libres, DPPH). Sin embargo, el aceite de chía es más susceptible a la oxidación cuando se incorpora en la DE que cuando se añade en forma líquida sin emulsionar, posiblemente debido al grado de interacción con las proteínas de la carne. El HxT demostró buena capacidad antioxidante, aunque el nivel de eficiencia dependió de la forma en que se incorporó en la matriz. HxT parece ejercer menos capacidad antioxidante cuando se incluye en la fase acuosa interna de la DE que cuando se solubiliza en agua y se añade sin encapsular.



Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt



Oxidative stability of meat systems made with $W_1/O/W_2$ emulsions prepared with hydroxytyrosol and chia oil as lipid phase



S. Cofrades ^{a,*}, J.A. Santos-López ^b, M. Freire ^a, J. Benedí ^b, F.J. Sánchez-Muniz ^c, F. Jiménez-Colmenero ^a

^a Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos y Nutrición (ICTAN-CSIC), Madrid, Spain

^b Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

^c Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 January 2014

Received in revised form

30 April 2014

Accepted 26 June 2014

Available online 3 July 2014

Keywords:

Double emulsions

Hydroxytyrosol

Chia oil

Lipid oxidation

Meat system

ABSTRACT

The aim of this paper was to evaluate the oxidative stability of healthier lipid cooked meat systems (MS) in which pork backfat was replaced by a double emulsion (DE, $W_1/O/W_2$) prepared with hydroxytyrosol (HXT) within an inner aqueous phase and chia oil as lipid phase. Physical characteristics of DEs and oxidative stability of DEs and MS during chilled storage were analysed. In DEs, which were highly stable, the presence of HXT improved oxidative stability, increasing ($P < 0.05$) DPPH free radical scavenging and ferric reducing ability (FRAP) and reducing ($P < 0.05$) levels of thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS). In MS, replacement of pork backfat by chia oil promoted lipid oxidation, which was more pronounced when chia oil was incorporated in the DE than when it was added in liquid form. HXT demonstrated antioxidant capacity, although it was less efficient when incorporated as part of a $W_1/O/W_2$ emulsion. In conclusion, MS including DE formulated with chia and HXT display oxidative stability throughout their commercial life, assuring successful development of potential healthier meat products.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Multiple (or double) emulsions are multi-compartmentalized systems in which oil-in-water (O/W) and water-in-oil (W/O) coexist, where the globules of the dispersed phase themselves contain even smaller dispersed droplets (Garti, 1997). The most common forms are water-in-oil-in-water ($W_1/O/W_2$). Double emulsions (DE) can be used to improve the lipid characteristics of foods by reducing fat content or providing healthier fatty acid profiles (Jiménez-Colmenero, 2013). Although some technological strategies for improving fat content in meat products are available (Jiménez-Colmenero, 2007), the replacement of animal fats normally present in some foods (for example meat products) with DEs formulated with healthier lipid profile oils opens up new prospects for the development of potentially functional foods.

Interest in Chia (*Salvia hispanica* L.) oil has grown recently, since it is very rich in α -linolenic acid, contains relatively low levels of saturated fatty acids and does not contain any of the antinutritional compounds or vitamin B₆ antagonist factors present in other

sources of α -linolenic acid (Ayerza & Coates, 2005). Diets enriched with chia oil increase high density lipoprotein (HDL) and n-3 polyunsaturated fatty acids (n-3 PUFA) and reduce cholesterol in rat serum (Ayerza & Coates, 2005).

Prevention of lipid oxidation is a prerequisite for successful development of foods enriched with lipids containing n-3 PUFAs. Due to safety and toxicity problems with synthetic antioxidants, there is increasing interest in natural compounds to delay the oxidation process in meat and to act as an antioxidant in the body, thus reducing the risk of various diseases related to the production of free radicals (Bastida et al., 2009). Olive oil's phenolic compounds, such as hydroxytyrosol (HXT, 3,4-dihydroxyphenylethanol), have attracted much attention because of their technological advantages (e.g. they enhance food lipid stability) and beneficial health properties (Medina, Lois, Alcantara, Lucas, & Morales, 2009). HXT can be used as a functional food ingredient, especially in PUFA-enriched foods, including meat products (Cofrades et al., 2011; DeJong & Lanari, 2009). DEs have been used to encapsulate bioactive compounds and would be of interest in the case of antioxidants in PUFA-enriched DEs (Jiménez-Colmenero, 2013). Although chia oil has been used as a lipid phase in the primary emulsion to improve the lipid profile of $W_1/O/W_2$ emulsions (Carrillo-Navas et al., 2012), as far as the authors are aware there have been no studies on the

* Corresponding author. Tel.: +34 91 549 23 00; fax: +34 91 549 36 27.

E-mail addresses: scofrades@ictan.csic.es, scofrades@if.csic.es (S. Cofrades).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.06.051>

0023-6438/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

6.2 Publicación No 2

Chia oil-enriched restructured pork effects on liver oxidative and inflammatory status of aged rats fed high cholesterol/high fat diets

Santos-López J. A., Garcimartín A., López-Oliva Ma. E., Bautista-Ávila M., González-Muñoz Ma. J., Bastida S., Benedí J., Sánchez-Muniz F. J.

Journal of Medicinal Food, 2017, 1–10

InCites Journal Citation Reports (2015). Índice de Impacto: 1.844 (46/125, Q2, Food Science & Technology)

Resumen: El presente trabajo tiene como objetivo analizar el efecto del consumo de un cárnico enriquecido (RP) con aceite de chía (una de las fuentes naturales más ricas en ALA) o hidroxitirosol en ratas envejecidas en un modelo de esteatohepatitis no alcohólica (NASH). Los animales se dividieron grupos de seis ratas macho Wistar (1 año de edad) y fueron alimentadas con las dietas experimentales durante ocho semanas: Dieta control (C), preparada a partir de la dieta semi-sintética modificada, sin colesterol añadido, a la que se incorpora el cárnico control sin enriquecer. Dieta control hipercolesterolemiantes (HC), elaborada como la dieta C pero en este caso parte del almidón de maíz fue reemplazado por 1.26% de colesterol y 0.25% de ácido cólico. Las dietas hipercolesterolemiantes con cárnicos enriquecidos con HxT o aceite de chía (HxT o CHIA), similares a HC, pero que incorporan dentro del cárnico alguno de estos tres compuestos. Se determinaron el colesterol total, el índice hepatosomático, la expresión de Nrf2, y los principales marcadores de defensa antioxidante. En el grupo de CHIA se redujo el efecto hipercolesterolemiantes disminuyendo los niveles plasmáticos a valores similares que C; también se demostró una mejora en el índice redox. CHIA, a pesar de poseer un alto contenido de AGP, redujo los niveles de peroxidación lipídica (TBARS) e indujo la menor síntesis de proteína de SOD, pero no una reducción de su actividad enzimática. El aceite de chía activó la expresión del Nrf2 como posible mecanismo alternativo para detener la respuesta pro-oxidativa ante un exceso de colesterol y envejecimiento. Los resultados subrayan la importancia de incorporar ALA en la dieta.

Chia Oil–Enriched Restructured Pork Effects on Oxidative and Inflammatory Status of Aged Rats Fed High Cholesterol/High Fat Diets

Jorge Arturo Santos-López,¹ Alba Garcimartín,² María Elvira López-Oliva,³ Mirandeli Bautista-Ávila,⁴ María José González-Muñoz,⁵ Sara Bastida,² Juana Benedí,¹ and Francisco José Sánchez-Muniz²

¹Pharmacology Department, Pharmacy School, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain.

²Nutrition and Food Science Department I (Nutrition), Pharmacy School, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain.

³Departmental Section of Physiology, Pharmacy School, Complutense University of Madrid, Madrid, Spain.

⁴Academic Pharmacy Area, Autonomous Hidalgo State University, Hidalgo, Mexico.

⁵Biomedical Sciences Department, Toxicology Teaching Unit, Pharmacy School, Alcalá University, Alcalá de Henares, Spain.

ABSTRACT Chia oil has the highest recognized α -linolenic acid (ALA) content. ALA is associated with beneficial changes in plasma lipids and the prevention of cardiovascular diseases. Present article aims to analyze the effect of Chia oil–enriched restructured pork (RP) on aged rats in a nonalcoholic steatohepatitis (NASH) model. Groups of six male Wistar rats (1-year old) were fed the experimental diets: control RP diet (C) noncholesterol high saturated; cholesterol-enriched high-saturated fat/high-cholesterol control RP diet (HC) with added cholesterol and cholic acid; and Chia oil- or Hydroxytyrosol RP cholesterol-enriched high-saturated fat/high cholesterol (CHIA and HxT). Total cholesterol, hepatosomatic index, *Nrf2*, antioxidant, and inflammation markers were determined. CHIA reduced the hypercholesterolemic effect by lowering levels similar to C; also, ameliorated redox index. CHIA, despite high polyunsaturated fatty acids (PUFA) content, reduced thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and induced the lowest SOD protein synthesis but not a reduction on its activity. Chia oil activated the *Nrf2* to arrest the pro-oxidative response to cholesterol and aging. Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) system was lower in HxT than in CHIA, suggesting its antiatherogenic activity and related protective effect against high PUFA. Increase in tumor necrosis factor alpha (TNF α) was partially blocked by CHIA. Chia oil has the ability to prevent oxidative damage and modify the inflammatory response, suggesting adequate regulation of the antioxidant system. Results stress the importance of incorporating ALA into the diet.

KEYWORDS: • ageing • antioxidant • cholesterol • inflammation • NASH • restructured pork

INTRODUCTION

MEAT IS A well-accepted and appealing food. Due to its high nutritional value, it plays a central role in human development. Meat and meat products are important sources of proteins, minerals, and vitamins,¹ although their consumption has been associated with degenerative diseases.² Consumption of red meat has been linked to an increase in nonalcoholic steatohepatitis (NASH), a progressive stage of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD), which includes steatosis, inflammation, and oxidation, and can develop into liver cirrhosis and end-stage liver disease through liver fibrosis.^{3,4}

NAFLD is now one of the most common liver diseases worldwide. Its pathogenesis includes high dietary fat intake,

insulin resistance, oxidative stress, and genetic background. It is also frequently associated with obesity, type 2 diabetes (T2DM), dyslipidemia, metabolic syndrome, and cardiovascular diseases,⁵ degenerative diseases in which ageing is a relevant and known risk factor. As it has been suggested that there are similarities between 1-year-old rats and 60-year-old men, we selected rats of this age for our animal model.⁶ In recent years, it has been suggested that NAFLD is impaired by a liver excess of ω -6 and deficiency of ω -3 polyunsaturated fatty acids (PUFA), which cause the impairment of ω -6/ ω -3 ratio.⁷

In the process of obtaining healthier meat products, a number of modifications could be made to add, reduce, or increase substances with proven biological properties (functional ingredients).⁸ Previous studies by our group have shown the beneficial effects that restructured pork (RP) containing seaweed, glucomannan, or silicon have on plasma cholesterol and antioxidant status.^{6,9,10}

Some epidemiological studies have suggested that high dietary concentrations of α -linolenic acid (ALA, 18:3 ω -3)

Manuscript received 2 November 2016. Revision accepted 5 February 2017.

Address correspondence to: Juana Benedí, PhD, Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, Madrid 28040, Spain, E-mail: jbenedi@ucm.es or Francisco José Sánchez-Muniz, PhD, Departamento de Nutrición y Bromatología I (Nutrición), Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n, Madrid 28040, Spain, E-mail: fjasan@ucm.es

6.3 Publicación No 3

Effects of silicon vs. hydroxytyrosol-enriched restructured pork on liver oxidation status of aged rats fed high-saturated/high-cholesterol diets

Santos-López J. A., Garcimartín A., Merino P., López-Oliva M.E., Bastida S., Benedí J., Sánchez-Muniz F. J.

PLoS ONE 11(1): e0147469

InCites Journal Citation Reports (2015). Índice de Impacto: 3.057 (11/63, Q1, Multidisciplinary Sciences)

Resumen: Este estudio fue diseñado para evaluar los efectos del silicio (Si) o del hidroxitirosol (HxT) incorporados en un cárnico enriquecido (RP), sobre la defensa antioxidante del hígado en ratas envejecidas alimentadas con dietas de alto contenido en colesterol/grasas saturadas como modelo de NASH. Se prepararon cuatro dietas: Dieta control (C), preparada a partir de la dieta semi-sintética modificada, sin colesterol añadido, a la que se incorpora el cárnico control sin enriquecer. Dieta control hipercolesterolemia (HC), elaborada como la dieta C pero en este caso parte del almidón de maíz fue reemplazado por 1.26% de colesterol y 0.25% de ácido cólico. Las dietas hipercolesterolemiantes con cárnicos enriquecidos con HxT o silicio (HxT o Si), similares a HC, pero que incorporan dentro del cárnico alguno de estos tres compuestos. Grupos de seis ratas Wistar machos (1 año de edad) fueron alimentados con estas dietas modificadas durante ocho semanas. Se determinaron el colesterol total, el índice hepatosomático, los marcadores de expresión de Nrf2 y defensa antioxidante (CAT, SOD, GSH, GSSG, GR, GPx). Tanto las dietas Si como HxT mejoraron el estado antioxidante del hígado, redujeron el índice hepatosomático y aumentaron la actividad de SOD. La inhibición del peróxido de hidrógeno (ROS) por parte del Si o HxT parece explicar este efecto, en función a que el valor del índice redox era incluso menor que C sin cambiar la actividad de CAT. Los resultados observados para Si fueron bastante mejores que CHOL-HxT en la mayoría de los parámetros medidos. Nuestro estudio sugiere que el Si incorporado en la matriz del RP fue capaz de contrarrestar, de manera más eficiente que

RESULTADOS

el HxT, el efecto negativo del consumo de una dieta alta en colesterol, mejorando las defensas antioxidantes hepáticas en el modelo de NASH.

RESEARCH ARTICLE

Effects of Silicon vs. Hydroxytyrosol-Enriched Restructured Pork on Liver Oxidation Status of Aged Rats Fed High-Saturated/High-Cholesterol Diets

Jorge A. Santos-López¹*, Alba Garcimartín^{1,2}, Pinar Merino³, M. Elvira López-Oliva⁴, Sara Bastida², Juana Benedí¹, Francisco J. Sánchez-Muniz^{2*}

1 Department of Pharmacology, School of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, **2** Department of Nutrition and Food Science, School of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, **3** Department of Biomedical Sciences, Teaching Unit of Toxicology, School of Pharmacy, Universidad de Alcalá, Madrid, Spain, **4** Department of Physiology, School of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

* These authors contributed equally to this work.

* frasan@ucm.es



OPEN ACCESS

Citation: Santos-López JA, Garcimartín A, Merino P, López-Oliva ME, Bastida S, Benedí J, et al. (2016) Effects of Silicon vs. Hydroxytyrosol-Enriched Restructured Pork on Liver Oxidation Status of Aged Rats Fed High-Saturated/High-Cholesterol Diets. PLoS ONE 11(1): e0147469. doi:10.1371/journal.pone.0147469

Editor: Manuel Portero-Otin, Universitat de Lleida-IRBLLEIDA, SPAIN

Received: September 29, 2015

Accepted: January 4, 2016

Published: January 25, 2016

Copyright: © 2016 Santos-López et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: Supported by AGL 2011-29644-C02-02. J. A. S.-L. received the foreign PhD studies fellowship from CONACYT-México, and A. G. received a predoctoral fellowship (grant BES-2012-054752) (FPI).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Background

Pork is an essential component of the diet that has been linked with major degenerative diseases and development of non-alcoholic steatohepatitis (NASH). Previous studies have demonstrated the in vitro antioxidant activity of silicon (Si). Furthermore, when Si is added to restructured pork (RP) strongly counterbalances the negative effect of high-cholesterol-ingestion, acting as an active hypocholesterolemic and hypolipemic dietary ingredient in aged rats.

Objective

This study was designed to evaluate the effects of Si vs hydroxytyrosol (HxT) RP on liver antioxidant defense in aged rats fed cholesterol-enriched high saturated/high cholesterol diets as a NASH model.

Methods

Four diets were prepared: Control RP diet (C) with non-added cholesterol; Cholesterol-enriched high-saturated/high-cholesterol control RP diet (CHOL-C) with added cholesterol and cholic acid; Si- or HxT-RP cholesterol-enriched high-saturated/high-cholesterol diets (CHOL-Si and CHOL-HxT). Groups of six male Wistar rats (1-yr old) were fed these modified diets for eight weeks. Total cholesterol, hepatosomatic index, liver *Nrf2* and antioxidant (CAT, SOD, GSH, GSSG, GR, GPx) markers were determined.

6.4 Publicación No 4

Silicon-enriched restructured pork affects the lipoprotein profile, VLDL oxidation, and LDL receptor gene expression in aged rats fed an atherogenic diet

Santos-López J. A., Garcimartín A., Bastida S., Benedí J., Sánchez-Muniz F. J.

Journal of Nutrition 145(9): 2039-2045

InCites Journal Citation Reports (2015). Índice de Impacto: 3.740 (17/80, Q1, Nutrition & Dietetics)

Resumen: Este estudio fue diseñado para evaluar el efecto del consumo de un cárnico enriquecido con silicio sobre la lipemia, el perfil de lipoproteínas y los marcadores de oxidación de ratas envejecidas alimentadas con dietas ricas en grasas saturadas y enriquecidas con colesterol. Se prepararon los cárnicos enriquecidos mezclando carne de cerdo magra y manteca de cerdo sola o con silicio (1,3 g Si/kg de materia fresca) bajo condiciones controladas y posterior liofilización. Las dietas experimentales se prepararon mezclando 78,3% de dieta purificada con 21,7% de cárnico liofilizado. Se alimentaron tres grupos de ratas wistar de 6 animales envejecidos cada uno (de 1 año de edad) durante 8 semanas con una dieta control (C), una dieta adicionada con agentes inductores de colesterolemia (HC) (similar a C pero enriquecida con 1,26% de colesterol más 0,25% de ácido cólico), y otra dieta con el cárnico enriquecido con silicio (Si) (similar a HC, pero conteniendo silicio dentro del cárnico). Se determinaron las concentraciones de lípidos plasmáticos, el perfil de lipoproteínas, el grado de oxidación de VLDL, y la expresión del gen del receptor de LDL (*Ldlr*). Los resultados de este estudio demuestran que en comparación con la dieta C, la dieta de HC no modificó la ingesta de alimento ni el peso corporal, pero aumentó significativamente ($P<0.05$) el colesterol plasmático (32%) y los lípidos totales (19%), VLDL y el colesterol IDL+LDL (ambos $>600\%$), lípidos totales y proteínas (ambos $>300\%$), y el grado de oxidación de VLDL [dienos conjugados $>250\%$; (TBARS), 900%] y redujo la expresión de *Ldlr* (64%) y la actividad de la arilesterasa hepática (54%). La dieta de Si parcialmente normalizó los cambios inducidos por la dieta de HC. En comparación con el grupo HC, los ratones del grupo Si presentaron concentraciones más bajas de VLDL ($P<0.001$, por ejemplo, 75% menos de colesterol

RESULTADOS

VLDL) y oxidación de VLDL (65% menos dienos conjugados y 85% menos TBARS) pero mayor expresión de *Ldlr* 200%. En conclusión, el silicio añadido al cárnico disminuyó el efecto negativo de la ingesta de colesterol, funcionando como una dieta hipocolesterolemiantes, hipolipémica y antioxidante.

Silicon-Enriched Restructured Pork Affects the Lipoprotein Profile, VLDL Oxidation, and LDL Receptor Gene Expression in Aged Rats Fed an Atherogenic Diet¹⁻³

Alba Garcimartín,^{4,6} Jorge A Santos-López,^{4,6} Sara Bastida,⁵ Juana Benedí,⁴ and Francisco J Sánchez-Muniz^{5*}

Departments of ⁴Pharmacology and ⁵Nutrition and Food Science, School of Pharmacy, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain

Abstract

Background: Research has shown that silicon can play an important role in protecting against degenerative diseases. Restructuring pork by partially disassembling meat permits the incorporation of active components with potential functional effects. However, there has been no research to date on the impact that silicon, as a functional ingredient in restructured pork (RP), has on lipoprotein composition, metabolism, and oxidation.

Objective: This study was designed to evaluate the effect of silicon-enriched RP on lipemia, lipoprotein profile, and oxidation markers of aged rats fed high-fat, high-energy, cholesterol-enriched diets.

Methods: RP samples similar to commercial sausages (16% protein and 22% fat, wt:wt) were prepared by mixing lean pork and lard alone or with silicon (1.3 g Si/kg fresh matter) under controlled conditions and then freeze-dried. Saturated fat-rich diets were designed by mixing 78.3% purified diet with 21.7% freeze-dried RP. Three groups composed of 8 aged male Wistar rats (1 y old) were fed for 8 wk a control RP (C) diet, a cholesterol-enriched RP (Chol-C) diet [C diet enriched with 1.26% cholesterol plus 0.25% cholic acid, or a cholesterol and silicon-enriched RP (Chol-Si) diet (same as the Chol-C diet but containing silicon)]. Plasma lipid concentrations, lipoprotein profile, the degree of VLDL oxidation, and LDL receptor gene (*Ldlr*) expression were tested.

Results: Compared with the C diet, the Chol-C diet did not modify food intake or body weight but significantly increased ($P < 0.05$) plasma cholesterol (32%) and total lipids (19%), VLDL and intermediate density lipoprotein + LDL cholesterol (both >600%), total lipids and proteins (both >300%), and the degree of VLDL oxidation [conjugated dienes >250%; thiobarbituric acid-reactive substance (TBARS), 900%] and reduced *Ldlr* expression (64%) and liver arylesterase activity (54%). The Chol-Si diet partially normalized changes induced by the Chol-C diet. Compared with the Chol-C group, Chol-Si rats had lower VLDL compound concentrations ($P < 0.001$; e.g., 75% less VLDL cholesterol) and VLDL oxidation (65% less conjugated dienes and 85% less TBARS) but greater *Ldlr* expression (200%).

Conclusions: Silicon added to RP strongly counterbalanced the negative effect of high-cholesterol-ingestion, functioning as an active hypocholesterolemic, hypolipemic, and antioxidative dietary ingredient in aged rats. *J Nutr* 2015;145:2039–45.

Keywords: Wistar rats, aging, silicon, restructured pork, lipids, lipoproteins, LDL receptor, VLDL oxidation

Introduction

Meat and meat products are widely consumed in developed countries. Although they are a good source of valuable nutrients

(protein and vitamins and/or minerals), there is much epidemiologic evidence relating meat consumption to degenerative ailments such as cardiovascular disease (CVD)⁷ (1). Therefore, much research has been conducted on quantitative and/or qualitative modifications with a view to producing functional meats and meat products (2, 3). Restructuring pork by partially disassembling meat would allow for the incorporation of active

¹ Supported by AGL 2011-29644-C02-02 (Ministerio de Economía y Competitividad). A Garcimartín received a predoctoral fellowship (grant BES-2012-054752) [Formación de Personal Investigador (FPI)].

² Authors disclosures: A Garcimartín, JA Santos-López, S Bastida, J Benedí, and FJ Sánchez-Muniz, no conflicts of interest.

³ Supplemental Table 1 is available from the "Online Supporting Material" link in the online posting of the article and from the same link in the online table of contents at <http://jn.nutrition.org>.

⁶ These authors contributed equally to this work.

* To whom correspondence should be addressed. E-mail: frasan@ucm.es.

⁷ Abbreviations used: AE, arylesterase enzyme; AI, atherogenic index; C, control restructured pork; Chol-C, cholesterol-enriched restructured pork; Chol-Si, cholesterol and silicon-enriched restructured pork; CVD, cardiovascular disease; *fa/fa*, Zucker; *Ldlr*, LDL receptor gene; RP, restructured pork; SRB1, scavenger receptor B1.

6.5 Publicación No 5

Lipoprotein profile in aged rats fed chia oil- or hydroxytyrosol-enriched meat in high cholesterol/high saturated fat diets

Santos-López J. A., Garcimartín A., Bastida S., Bautista-Ávila M., Sánchez-Muniz F. J., Benedí J.

Journal of Functional Foods (En revisión)

InCites Journal Citation Reports (2015). Índice de Impacto: 3.973 (8/125, Q, Food Science & Technology)

Resumen: Se ha demostrado que los AGP omega-3 son importantes en la prevención de trastornos metabólicos. La reestructuración de carne de cerdo (RP) mediante el la sustitución de alguno de sus componentes permite la incorporación de componentes activos con potenciales efectos funcionales. *Salvia hispanica* L. (chía) es una de las fuentes naturales más ricas de ALA. Los estudios han demostrado que el aceite de chía mejora el perfil lipoproteico. El HxT, se ha utilizado como un ingrediente funcional en alimentos enriquecidos con AGP debido a sus propiedades antioxidantes, de esta forma sus actividades lipolipémicas han sido evaluadas en animales de experimentación. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del consumo de un cárnico enriquecido con aceite de chía o HxT sobre el perfil de lipoproteínas en ratas envejecidas. Se prepararon muestras de reestructurados cárnicos similares a las salchichas comerciales mezclando carne de cerdo magra y manteca de cerdo con o sin aceite de chía o HxT (152,2 g / kg de materia fresca o 3,6 g / kg de materia fresca, respectivamente). Las dietas hipercolesterolemiantes fueron diseñadas mezclando 78,3% de dieta semisintética con 21,7% de RP liofilizada. Cuatro grupos de ratas Wistar macho de 1 año de edad fueron alimentados con dietas experimentales durante 8 semanas. Dieta control (C), preparada a partir de la dieta semisintética modificada, sin colesterol añadido, a la que se incorpora el cárnico control sin enriquecer. Dieta control hipercolesterolemiante (HC), elaborada como la dieta C pero en este caso parte del almidón de maíz fue reemplazado por 1.26% de colesterol y 0.25% de ácido cólico. Las dietas hipercolesterolemiantes con cárnicos enriquecidos con HxT, aceite de chía o silicio (HxT, CHIA, Si), similares a HC, pero que incorporan dentro del cárnico

RESULTADOS

alguno de estos tres compuestos. Se determinó el perfil lipídico en plasma, el perfil lipoproteico y la expresión del gen del receptor de LDL (*Ldlr*). En comparación con la dieta C, la dieta HC no modificó la ingesta de alimento ni el peso corporal, pero aumentó significativamente ($P<0,05$) el colesterol plasmático y los lípidos totales, VLDL e IDL + LDL-colesterol, y proteínas, mientras que redujo la expresión de *Ldlr*. Las dietas CHIA o HxT modificaron parcialmente los cambios inducidos por la dieta HC. Por lo tanto, en comparación con las ratas HC, las ratas CHIA o HxT mostraron concentraciones de los componentes de VLDL más bajas ($P<0,001$). El Aceite de Chía y el HxT detuvieron parcialmente los efectos negativos de las dietas hipercolesterolemizantes sobre los marcadores de lipemia y lipoproteinemia. Los resultados apoyan la recomendación de incluir estos ingredientes en derivados del cerdo con énfasis en el consumo de los mismos por personas mayores.

Lipoprotein profile in aged rats fed chia oil- or hydroxytyrosol-enriched meat in high cholesterol/high saturated fat diets

Jorge A. Santos-López¹, Alba Garcimartín², Sara Bastida², Mirandeli Bautista-Ávila³,
Francisco J. Sánchez-Muniz², Juana Benedí^{1*}

Received: March 2017

Abstract It has been recognized that omega-3 polyunsaturated fatty acids are important in the prevention of metabolic disorders. Restructuring pork (RP) by partially disassembling would permit the incorporation of active components with potential functional effects. *Salvia hispanica* L. (chia) is the one of the richest natural sources of α -linolenic acid. Studies have shown that chia oil improves lipoprotein profile. Hydroxytyrosol (HxT), has been used as a functional ingredient in PUFA-enriched foods due to its antioxidant properties, its lipolipemic activities have been evaluated in rats. The aim was to evaluate the effect of chia oil or HxT-enriched RP on lipoprotein profile of aged rats fed high-cholesterol/high-saturated-fat diets. RP samples similar to commercial sausages were prepared by mixing lean pork and lard with or without Chia oil or HxT (152.2 g/kg fresh matter or 3.6 g/kg fresh matter). Saturated fat diets were designed mixing 78.3% semisynthetic diet with 21.7% freeze-dried RP. Four groups of 1-year male Wistar rats were fed the experimental diets for 8 weeks. C, control RP diet; HC, Cholesterol enriched high-saturated/high-cholesterol control RP diet; HxT, hydroxytyrosol RP Cholesterol enriched high-saturated/high-cholesterol diet; CHIA, chia oil RP Cholesterol enriched high-saturated/high-cholesterol diet. Plasma lipid, lipoprotein profile, and LDL receptor gene (Ldlr) expression were tested. Compared to the C diet, the HC diet did not modify food intake or body weight but significantly increased ($P<0.05$) plasma cholesterol and total lipids, VLDL and IDL+LDL-cholesterol, total lipids and proteins, while reducing Ldlr expression. The CHIA or HxT diets partially normalized changes induced by the HC diet. Therefore, compared to the HC rats, the CHIA or HxT rats had lower VLDL compound concentrations ($P<0.001$). Chia oil and HxT partially arrested the negative effects of cholesterol feeding on lipemia and lipoproteinemia. Results support the recommendation to include these ingredients in pork derivatives targeting elderly persons.

Keywords Aging, chia oil, hydroxytyrosol, lipoprotein.

- ¹ Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n. 28040-Madrid. Spain
- ² Departamento de Nutrición y Bromatología I. Facultad de Farmacia Universidad Complutense de Madrid, Plaza Ramón y Cajal s/n. 28040-Madrid. Spain
- ³ Área Académica de Farmacia, Instituto de Ciencias de la Salud Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Ex Hacienda la Concepción s/n. Carr. Pachuca-Tilcuautla 42060. Hidalgo. Mexico

Introduction

Pork and pork products are widely consumed in developed countries. Although they are good source of protein, vitamins and/or minerals, there is a lot of epidemiological evidence relating meat consumption to degenerative disease such as cardiovascular disease (CVD) [10,9,19] or imbalance in lipid profile. There has therefore been much research into quantitative and/or qualitative modifications with a view to producing functional meats and meat products [20,26]. Restructuring pork, by partially disassembling meat, would permit to incorporate active components with potential functional effects [19,26,20]. Our research group has found that consumption of walnut enriched meat products improved the antioxidant and lipoprotein profile of volunteers at CVD risk [20]. In the case of seaweed-enriched restructured pork (RP), these CVD risk markers in cholesterol-fed rats largely depend on the type and composition of seaweed included [39].

It has been recognized that adjustments in the quality of dietary lipids, such as omega-3 polyunsaturated fatty acids (ω -3 PUFA) are important in the prevention of metabolic disorders [16]. In this regard, interest in α -linolenic acid (ALA; 18:3 ω -3) as a functional ingredient has grown in the recent years because of its association with improvements in plasma lipid concentrations and CVD [12,24]. Nevertheless, there are few foods that can provide adequate amounts to obtain the benefits associated with ALA consumption [43].

6.6 Publicación No 6

Chia oil- or hydroxytyrosol-enriched restructured pork enhances fatty acid oxidation in aged rats fed high saturated fat/high cholesterol diets

Santos-López J. A., López-Oliva M. E., Garcimartín A., Bautista-Ávila M., González-Muñoz M. J., Bastida S., Sánchez-Muniz F. J., Benedí J.

Journal of Lipid Research (En revisión)

InCites Journal Citation Reports (2015). Índice de Impacto: 4.368 (67/289, Q1, Biochemistry & Molecular Biology)

Resumen: La acumulación de lípidos a nivel hepático y el metabolismo energético son controlados por la proteína quinasa activada por AMP (AMPK), y en consecuencia a través de la beta-oxidación. El aceite de chía es una de las fuentes más ricas de ácido α -linolénico (omega-3). Estudios previos han demostrado su capacidad para disminuir el colesterol, la proporción de lipoproteína de baja densidad, los triglicéridos, aumentar los niveles de lipoproteína de alta densidad, mejora los lípidos en la sangre y la resistencia a la insulina. El HxT, ha demostrado capacidad para la reducción de triglicéridos y el colesterol-LDL, y el aumento de colesterol-HDL. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto del aceite de chía o hidroxitirosol sobre el metabolismo lipídico en el hígado de ratas envejecidas. Los grupos de ratas Wistar macho (1 año de edad) fueron alimentados 8 semanas con una dieta control RP (C); dieta RP (HC) enriquecida con colesterol (dieta C enriquecida con colesterol y ácido cólico); dieta enriquecida con aceite de chía o hidroxitirosol (CHIA o HxT) (igual que HC pero conteniendo aceite de chía o hidroxitirosol). Se analizaron marcadores de lipogénesis, beta-oxidación, resistencia a la insulina y lipemia. Los resultados muestran los efectos de las dietas CHIA o HxT sobre la oxidación de ácidos grasos aumentando la expresión y la actividad de AMPK y CPT-1a, con mejoras en la resistencia a la insulina y la lipemia. Los datos apoyan el uso de estos ingredientes funcionales en la prevención contra la lipogénesis y la acumulación de lípidos en el hígado, en el marco de una dieta rica en grasas en ratas ancianas.



Chia oil- or hydroxytyrosol-enriched restructured pork enhances fatty acid oxidation in aged rats fed high saturated fat/high cholesterol diets

Jorge Arturo Santos-López^{a†}, Ma. Elvira López-Oliva^{b†}, Alba Garcimartín^c, Mirandeli Bautista-Ávila^d, María José González-Muñoz^e, Sara Bastida^c, Francisco José Sánchez-Muniz^c, Juana Benedí^{a*}

^a Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, 28040

^b Sección Departamental de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, 28040

^c Departamento de Nutrición y Bromatología I, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, 28040

^d Área Académica de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo, Mexico, 42060

^e Departamento de Ciencias Biomédicas. Unidad Docente de Toxicología. Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Spain, 28805

[†] These authors contributed equally to this paper and must be considered as first authors.

*Corresponding author: Juana Benedí, PhD. jbenedi@ucm.es



✦ Author's Choice

Running title: Chia or hydroxytyrosol restructured pork on fatty acid oxidation

Abstract

Lipid accumulation and energy metabolism are controlled by AMP-activated protein kinase (AMPK) through beta-oxidation. Chia oil is the richest source of α -linolenic acid. It may lower cholesterol, low density lipoprotein, triglycerides, increase high density lipoprotein, improves blood lipids and insulin resistance. Hydroxytyrosol, has shown reduction of triglycerides and LDL-cholesterol, and increase HDL-cholesterol. The aim was to evaluate the effect of chia oil or hydroxytyrosol could have on the lipid metabolism in aged rats. Groups of male Wistar rats (1 year old) were fed 8 weeks a control RP (C) diet; a cholesterol-enriched RP (HC) diet (C diet enriched

with cholesterol and cholic acid); or a chia oil- or hydroxytyrosol-enriched RP (CHIA or HxT) diet (same as HC but containing chia oil or hydroxytyrosol). Liver lipogenesis, beta-oxidation, insulin resistance and lipemia were analysed. Results show the effects of CHIA or HxT diets on the fatty acid oxidation by increasing the expression and activity of AMPK and CPT-1 α , with improvements on insulin resistance and lipemia. Data support the use of these functional ingredients in the prevention against lipogenesis and lipid accumulation on liver, in the frame of a high-fat diet in aged rats.

Keywords: chia oil, hydroxytyrosol, beta-oxidation, high-saturated-fat diet, lipid metabolism, restructured pork.

6.7 Publicación No 7

Silicon-enriched restructured pork affects the lipoprotein profile, VLDL oxidation, and LDL receptor gene expression in aged rats fed an atherogenic diet

Santos-López J. A., López-Oliva M. E., Garcimartín A., Bautista-Ávila M., González-Muñoz M. J., Bastida S., Sánchez-Muniz F. J., Benedí J.

Liver International (En revisión)

InCites Journal Citation Reports (2015). Índice de Impacto: 4.470 (13/79, Q1, Gastroenterology & Hepatology)

Resumen: Estudios previos sugieren que la carne roja y sus derivados están relacionados con la diabetes mellitus tipo 2, el síndrome metabólico y las enfermedades hepáticas (como NAFLD). El metabolismo lipídico y la energía son controlados principalmente por la AMPK. Su activación disminuye la expresión de SREBP-1c e inhibe moléculas tales como la FAS, lo que conduce a una lipogénesis reducida y a la acumulación de lípidos hepáticos. El silicio ha demostrado mejorar el perfil lipoproteico y mejorar la defensa antioxidante. El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto que tiene el silicio en la lipogénesis hepática, cuando se incorpora a la carne en ratas ancianas. Se prepararon muestras de cárnico reestructurado (RP) mezclando carne de cerdo magra y manteca de cerdo sola o con el silicio añadido. Las dietas fueron diseñadas mezclando dieta semi-sintética con el RP liofilizado. Los grupos de ratas Wistar machos (1 año de edad) fueron alimentados 8 semanas con una dieta RP control (C); dieta RP (HC) enriquecida con colesterol (dieta C enriquecida con colesterol y ácido cólico); dieta hipercolesterolemia enriquecida con silicio (Si) (como HC pero que contiene silicio). Se analizaron parámetros de lipogénesis hepática, beta-oxidación, resistencia a la insulina y lipemia. La inclusión de Si afecta a la inhibición de la lipogénesis hepática al disminuir la expresión de SREBP-1c, ACC y FASN, con mejoras en la resistencia a la insulina y lipemia. Los datos apoyan el uso de este ingrediente funcional en la prevención contra la lipogénesis y la acumulación de lípidos en el hígado.

Lipogenesis inhibitory effect of Si-enriched restructured pork in aged rats fed high saturated fat/high cholesterol diets

Jorge Arturo Santos-López^{a*}, Ma. Elvira López-Oliva^{b*}, Alba Garcimartín^c, Mirandeli Bautista-Ávila^d, María José González-Muñoz^e, Sara Bastida^c, Francisco José Sánchez-Muniz^c, Juana Benedí^{a*}

^aDepartamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, 28040

^bSección Departamental de Fisiología, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, 28040

^cDepartamento de Nutrición y Bromatología I, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid, Spain, 28040

^dÁrea Académica de Farmacia, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Hidalgo, Mexico, 42060

^eDepartamento de Ciencias Biomédicas. Unidad Docente de Toxicología. Facultad de Farmacia, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares, Spain, 28805

* These authors contributed equally to this paper and must be considered as first authors.

*Corresponding author: Juana Benedí, PhD. jbenedi@ucom.es

Abstract

Background: Studies suggest that red meat and its derivatives are related to type 2 diabetes mellitus, metabolic syndrome and liver diseases (such as non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)). Lipid and energy metabolism is mainly controlled by AMP-activated protein kinase (AMPK). Its activation downregulates sterol regulatory element binding protein-1c (SREBP-1c), and inhibits molecules such as fatty acid synthase (FAS), leading to reduced lipogenesis and lipid accumulation. Silicon has demonstrated to improve lipoprotein profile and enhanced antioxidant defenses.

Aim: The aim was to evaluate the effect that silicon has on liver lipogenesis, when incorporated into meat in aged rats.

Methods: Restructured pork (RP) samples were prepared by mixing lean pork and lard alone or with silicon. Diets were designed by mixing purified diet with freeze-dried RP. Groups of male Wistar rats (1 y old) were fed 8 weeks a

control RP (C) diet; a cholesterol-enriched RP (HC) diet (C diet enriched with cholesterol and cholic acid); or a silicon-enriched cholesterol RP (Si) diet (as HC but containing silicon). Liver lipogenesis, beta-oxidation, insulin resistance and lipemia were analysed.

Results: Si inclusion affects inhibiting liver lipogenesis by decreasing the expression of SREBP-1c, ACC and FASN, with improvements on insulin resistance and lipemia.

Conclusion: Data support the use of this functional ingredient in the prevention against lipogenesis and lipid accumulation on liver.

Keywords: *Lipogenesis, silicon, restructured-pork, high-saturated-fat diet, lipid metabolism.*

VII. DISCUSIÓN INTEGRADORA

VII. DISCUSIÓN INTEGRADORA

El consumo de carne y derivados cárnicos es muy elevado en muchos países de todo el mundo [298], contribuyendo de forma relevante al estatus nutricional de sus consumidores [20,298]. No obstante, la estrecha relación epidemiológica encontrada entre el consumo de tales alimentos y la prevalencia incrementada de enfermedades degenerativas [299] ha demandado moderación en su ingesta, en particular de los productos procesados [298]. Sin embargo, la generalización de tal afirmación ha sido rebatida por diferentes grupos, considerando que la variedad de productos cárnicos es elevada y que difieren enormemente en su composición cárnica e ingredientes que incorporan [20]. Además en muchos casos los estudios observacionales consultados no cumplen con los criterios epidemiológicos señalados por Hill y cols. [300] por lo que deben ser contemplados con cautela. Aceptando que el consumo de cárnicos, por su contenido en grasa saturada, pueda ejercer efectos negativos sobre la salud [276,277] la inclusión de ingredientes con efectos positivos sobre el metabolismo lipoproteico, la peroxidación lipídica y otros aspectos relacionados, podría ser una herramienta que ayude a prevenir o contrarrestar los efectos negativos derivados de su consumo.

Hemos comentado en la revisión bibliográfica que el consumo de carne y derivados cárnicos es muy elevado, y que la matriz cárnica puede ser muy útil para incluir diversidad de ingredientes y formular cárnicos funcionales [19,21]. La adición de ingredientes bioactivos no solo aportaría componentes a la carne, sino que contrarrestaría algunos de los efectos potencialmente negativos que se atribuyen a su consumo [18,20]. Nuestro grupo de investigación tiene experiencia en la utilización de matrices cárnicas como base de ingredientes funcionales, que aunque siendo complejas no modifican las capacidades intrínsecas de los ingredientes que se le añaden [11,211,251,301]. En este sentido, la inclusión de HxT o Si a un cárnico aportaría efectos protectores frente el daño oxidativo en el propio cárnico, mientras que la incorporación de aceite de chía mejoraría el perfil de ácidos grasos del cárnico aportando ácidos de la familia omega-3 de reconocido efecto sobre la salud cardiovascular [57,215], y a nivel biológico modularían diversas funciones

de las que se tiene alguna evidencia científica, si bien la mayoría de ellas derivan del consumo de estos ingredientes aislados y no incorporados a productos cárnicos. Por ello, hemos estudiado el efecto del consumo de dietas enriquecidas con cárnicos funcionales sobre el peso corporal, metabolismo lipoproteico, regulación de la glucemia y resistencia a la insulina, y mecanismos de defensa antioxidante. Con la finalidad de acercarnos a las dietas occidentales aterogénicas actualmente consumidas que suponen un aumento del riesgo de NASH [302,303] se incluyó en la dieta agentes hipercolesterolemiantes (ácido cólico y colesterol), una proporción elevada de ácidos grasos saturados y un 20% de cárnico liofilizado conteniendo los ingredientes funcionales. Se utilizaron ratas de un año de edad, considerando que la edad es un factor agravante en el desarrollo de NAFLD [267], sin olvidar que las ratas viejas presentan diferencias respecto a las jóvenes en cuanto a una menor ingesta [304], la respuesta hipercolesterolemia frente a inductores [227], capacidad antioxidante [305], metabolismo lipoproteico [227], sensibilidad a la insulina, etcétera.

Para una mejor comprensión de la investigación realizada, la discusión se ha configurado en apartados siguiendo, dentro de lo posible, los objetivos, el diseño experimental e integrando los resultados contenidos dentro de las publicaciones incluidas en la presente memoria.

7.1 Estabilidad y capacidad antioxidante de las emulsiones dobles

7.1.1 Características físicas de las emulsiones $W_1/O/W_2$

La multiplicidad, la distribución de tamaños de partícula, y la evolución y cambio de las mismas a lo largo del tiempo se han observado mediante microscopia óptica. Los resultados muestran la estructura compartimentada de las mismas, consistente en gotas de aceite relativamente grandes (de diferentes tamaños) conteniendo algunas gotas de agua más pequeñas (**Figura 16**). Las gotas de aceite fueron generalmente mayores en la emulsión WOW-HxT (**Figura 16b**) que en WOW (**Figura 16a**), lo cual es consistente con el tamaño y distribución de partículas. En ambas emulsiones, con y sin HxT, el tamaño de las mismas disminuyó durante el periodo de almacenamiento (**Publicación 1**).

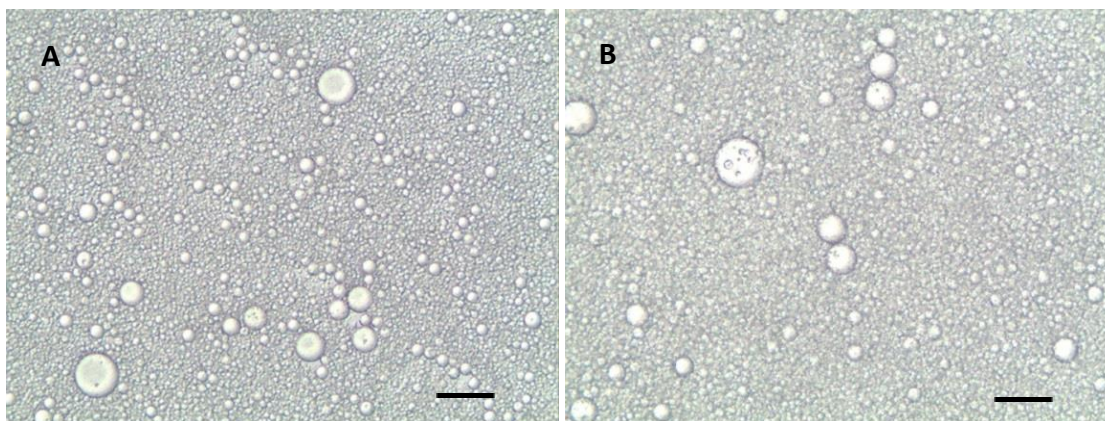


Figura 16. Microscopía óptica de las emulsiones a) WOW, b) WOW-HxT

Inicialmente, ambas emulsiones mostraron alta estabilidad, con pocos signos de separación de fases (proporción de cremación superior al 95% durante el periodo de almacenamiento). La emulsión inicial, WOW, mostró una distribución monomodal, que oscilaba entre 0,5 y 10-20 μm (**Figura 17a**), mientras que WOW-HxT presentó tendencia a ser bimodal, con predominio de partículas entre 0,5 y 20 μm y una pequeña proporción de otras entre 20 y 100 μm (**Figura 17b**). La emulsión WOW presentó ($P < 0,05$) un menor tamaño medio de partícula respecto a la WOW-HxT, así como menor intervalo del tamaño de las mismas (**Figura 17**). La distribución monomodal encontrada es consistente con estudios previos de dobles emulsiones usando PGPR como emulsificante lipofílico [28,306], no obstante también se han reportado distribuciones bimodales [307,308] o incluso trimodales [309]. Un ejemplo de distribución bimodal se ha descrito en emulsiones dobles elaboradas con aceite de chía como fase lipídica. Este mismo sistema es el encontrado en la distribución bimodal para WOW-HxT [310]. El tiempo de almacenamiento de las emulsiones a 4°C aumentó la distribución de frecuencia del tamaño de partícula, desarrollando un sistema bimodal en WOW, similar al descrito para WOW-HxT, con un estrechamiento de su intervalo (**Figura 17**), contribuyendo a aumentar la distribución de las mismas. Así, se muestra una disminución ($P < 0,05$) del tamaño medio de partícula ($D_{4,3}$) al tercer día de almacenamiento en WOW y en el día 7 en el caso de WOW-HxT, sin cambios posteriores en ninguna de las dos emulsiones. En cualquier caso, los cambios disminuyeron cuantitativamente, lo que indica una buena estabilidad durante el almacenamiento.

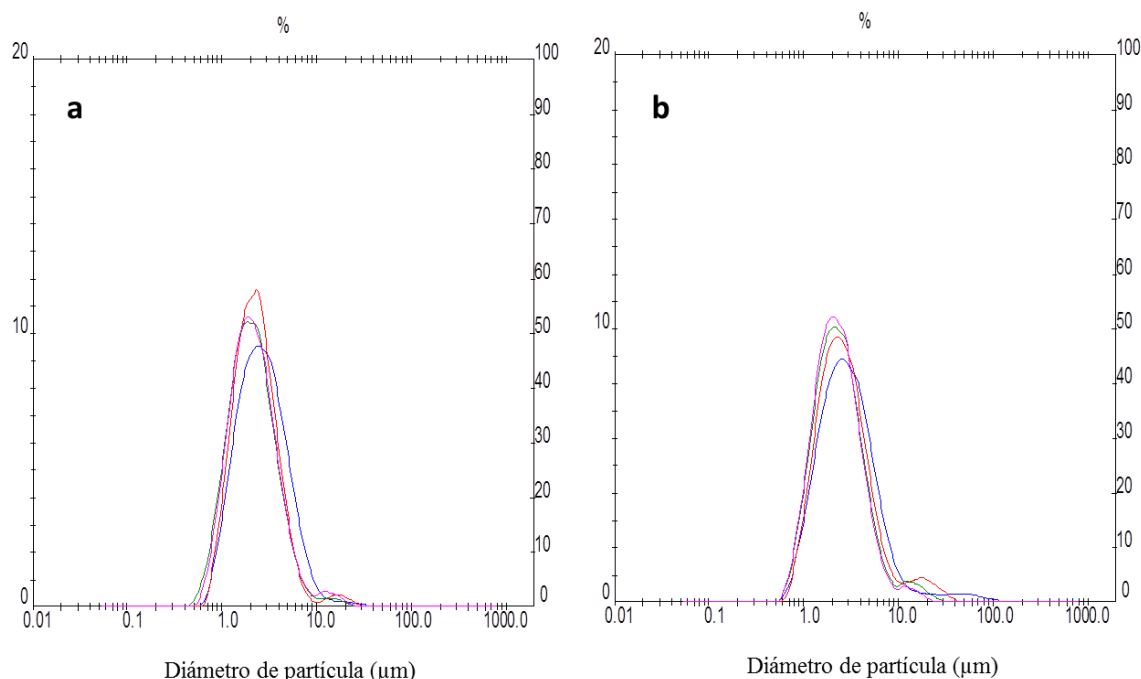


Figura 17. Influencia del tiempo de almacenamiento sobre el tamaño y distribución de partícula de las dobles emulsiones. Gráfico “a” corresponde a WOW y gráfico “b” corresponde a WOW-HxT. Día 1, azul; día 3, rojo; día 7, verde; día 10, rosa.

Se han descrito previamente estudios en los que los diámetros de partícula aumentan o permanecen sin cambios durante el periodo de almacenamiento [308,310], o incluso presentan una disminución del diámetro [311]. En nuestro estudio, el pequeño cambio observado en el tamaño de las partículas podría deberse al hinchamiento de las gotas de agua, que podrían haberse roto y drenado en la fase acuosa externa (W_2) [311]. Así cuando el HxT se incluye en la fase acuosa interna (W_1), el tamaño de las gotas de aceite aumenta, afectando a la distribución del tamaño de partícula. Hemar y cols. [307] informaron que la adición de resveratrol no produjo efectos obvios sobre la distribución del tamaño de partícula de las emulsiones múltiples, mientras que Choi y cols. [306] encontraron un aumento en el diámetro de partícula $D_{3,2}$ debido a la incorporación de hierro en la fase W_1 .

7.1.2 Capacidad antioxidante de las emulsiones $W_1/O/W_2$

Se han utilizado el método del DPPH y la capacidad reductora del FRAP para determinar la capacidad antioxidante de las emulsiones. El porcentaje de inhibición del DPPH, al inicio

del periodo de almacenamiento, fue un 20% en la emulsión con el antioxidante añadido frente a un 13% en la emulsión sin HxT, lo cual muestra la influencia de dicho antioxidante (**Figura 18**). Igualmente la emulsión que contiene el HxT encapsulado presenta una mayor capacidad reductora frente a la emulsión sin antioxidante (más de tres veces el valor (**Figura 19**). Esto permite comprobar que el polifenol confiere sus propiedades protectoras para el aceite emulsionado desde el momento de su adición.

Por otro lado, se observa que el factor tiempo de almacenamiento afecta significativamente a la capacidad antioxidante, y así, al cabo de 7 días de conservación se pierde el poder antioxidante del HxT y los compuestos propios del aceite, no observándose diferencias entre las dos emulsiones hasta el final del periodo de conservación [42]. Este fenómeno se asocia principalmente con la degradación de los compuestos propios del aceite de chía y a la oxidación de los fenoles mayoritarios. Las enzimas polifenoloxidasas tienen una alta actividad en el aceite de chía y pueden consumir compuestos fenólicos, como ácido elágico, dihidroflavonol, quercetin-3-glucorónido, kampferol y kampferol-3-glucorónido, entre otros, generando productos del pardeamiento enzimático que tienen muy poca actividad antioxidante [312]. Por otro lado, los tocoferoles del aceite de chía (38 µg/g) aportan entre el 65 y el 100% a la capacidad antioxidante total y dichos compuestos se reducen considerablemente durante el almacenamiento [313].

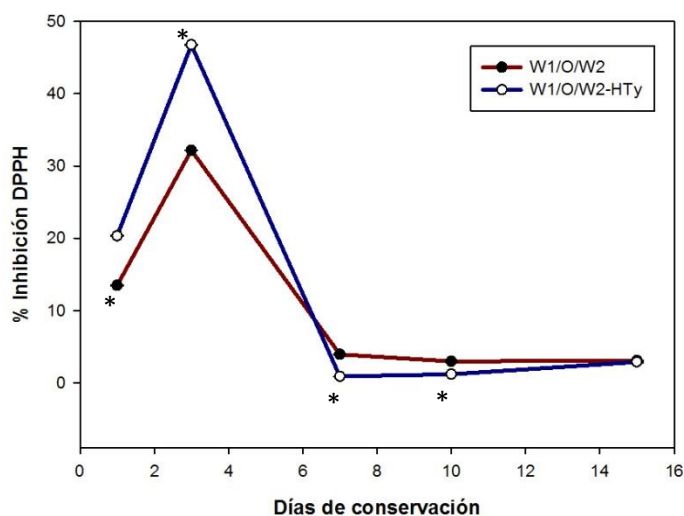


Figura 18. Porcentaje de inhibición de DPPH en las emulsiones dobles (*, $P < 0.05$).

La capacidad reductora disminuyó con el tiempo de conservación, aunque la tendencia observada difiere de obtenida con la técnica de DPPH. Estas diferencias pueden deberse a los distintos los mecanismos de reacción de óxido/reducción ensayados en ambas metodologías [314]. La pérdida del encapsulamiento del antioxidante dentro de la emulsión que reacciona con los subproductos de la descomposición lipídica, explicarían, al menos parcialmente, la disminución de la capacidad reductora de las muestras con el paso del tiempo de conservación.

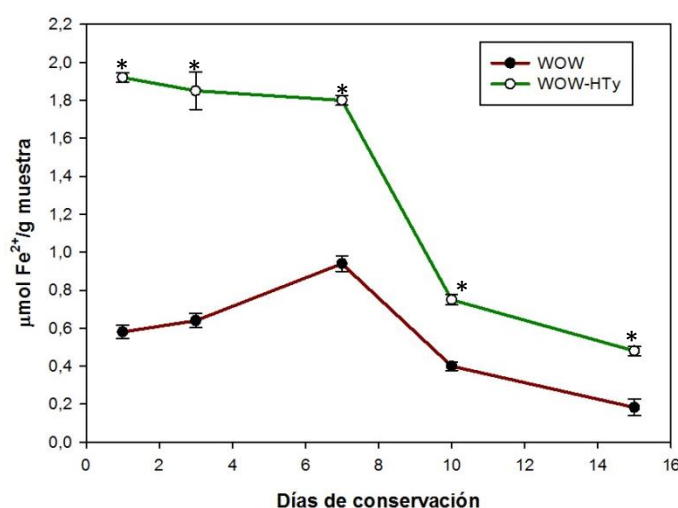


Figura 19. Capacidad reductora (FRAP) en las emulsiones dobles (*, P<0.05).

La **Figura 20** muestra las diferencias entre la oxidación lipídica de las emulsiones analizadas. La emulsión sin HxT presentó mayor peroxidación, tanto al principio como al final del periodo de conservación. El alto contenido de AGP del aceite de chía propicia que la peroxidación después de la elaboración de las emulsiones sea mayor debido a que el aceite es sometido a tratamientos térmicos cercanos a 60°C que, junto con el PGPR, favorecen la descomposición del mismo dentro de la emulsión [72,73].

Resultados similares a nuestro estudio han sido observados por Cofrades y cols. [74] quienes determinaron que la concentración de HxT que proporcionaba la mayor protección contra la peroxidación lipídica en emulsiones O/W era de 100 ppm.

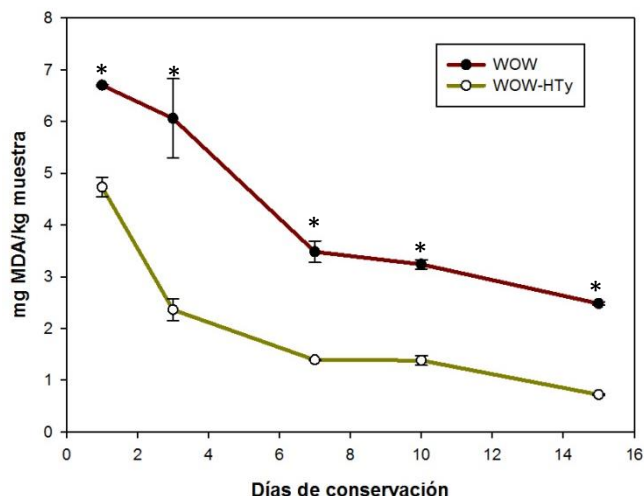


Figura 20. Peroxidación lipídica (TBARS) en las emulsiones dobles (*, $P < 0.05$).

El paso inicial en la oxidación de lípidos en emulsiones tiene lugar en la interfase aceite-agua (O-W) [315]; en el caso de WOW hay dos regiones de interfase (estabilizadas mediante agentes tensoactivos hidrófilos y lipófilos): W_1/O y O/W_2 . Se ha sugerido que en las emulsiones $W_1/O/W_2$ la fase lipídica está protegida por la fase acuosa externa (W_2). En nuestro experimento la diferencia en las propiedades físicas de las emulsiones era demasiado pequeña para ser considerada relevante. Por lo tanto, hubo un efecto antioxidante directo sobre la interfase W_1/O , que no habría ocurrido sin interacción entre el antioxidante y su correspondiente sustrato oxidable (promoviendo el aumento en los niveles de TBARS), aunque el sistema podría expresar su capacidad antioxidante (DPPH y FRAP).

La inhibición de la capacidad de oxidación lipídica de HxT en la fase W_1 de la emulsión parece estar relacionada con varios fenómenos. En primer lugar, su ubicación en la interfaz W/O permite al HxT entrar en contacto con el aceite de chía. La localización física de los antioxidantes como HxT en emulsiones depende de su lipofilicidad y solubilidad en agua. Aunque el HxT es hidrosoluble, tiene la capacidad de inhibir la oxidación de lípidos en emulsiones O/W [74,316], dicha actividad se encuentra generalmente relacionada con su ubicación en la interfase W/O [316]. Esta ubicación favorece la protección contra la oxidación del aceite de chía fuera de la fase W_1 . Este mecanismo ha sido identificado como el responsable de la actividad antioxidante de otros

compuestos fenólicos incorporados dentro de dobles emulsiones [317]. Es importante considerar, por otro lado, el potencial papel de los emulsionantes (lipófilos e hidrófilos), que pueden interactuar con muchos componentes del sistema y, por tanto, afectar a la oxidación de los lípidos. El caseinato usado como emulsionante hidrófilo, presente en la interfase entre el aceite de chía y la fase W_2 , ha demostrado ser altamente eficaz contra la oxidación de lípidos. Estas propiedades antioxidantes se han atribuido a su capacidad para inhibir productos de oxidación lipídica en la fase oleosa y quelar metales de transición presentes en el medio [318,319].

Como resultado de nuestro estudio (**Publicación 1**), podemos decir que el HxT protege eficazmente a las emulsiones contra la oxidación. Las emulsiones dobles mostraron buena estabilidad, incluso más de lo requerido para su aplicación en alimentos. Sin embargo, sería deseable, desde el punto de vista de la estabilidad oxidativa, usar estos ingredientes antes del día 3 de almacenamiento.

7.2 Estabilidad y capacidad antioxidante de sistemas modelo cárnicos

La oxidación de lípidos en sistemas heterofásicos, tales como las emulsiones, se reconoce generalmente como más compleja que en los sistemas con aceites líquidos sin emulsionar [320]. La oxidación lipídica es un problema importante en el procesamiento de los productos cárnicos. Los productos cárnicos son sistemas complejos en los que interactúan diferentes fases y constituyentes, p.e. aire, agua, lípidos y partículas sólidas. El enriquecimiento de estos productos con grasas insaturadas, la pérdida de integridad estructural, el procesamiento térmico, la incorporación de sales, el periodo de almacenamiento, etc., aumentan la velocidad y el grado de oxidación de los lípidos dentro de una matriz cárnica. Por otra parte, los antioxidantes endógenos (carnosina, anserina, enzimas antioxidantes, etc.) también pueden desempeñar un papel importante en la estabilidad oxidativa de la carne [321]. Dependiendo de todos estos factores, el equilibrio prooxidante-antioxidante de ellos puede afectar sustancialmente a la estabilidad oxidativa. Los sistemas cárnicos formulados en este experimento contenían concentraciones relativamente altas de grasa (más de 11 g/100 g) con altos niveles de

ácidos grasos insaturados (más de 5 g de AGP/100 g de producto); además, mostraron una considerable desintegración estructural, lo que favoreció la exposición y la reactividad de compuestos con el oxígeno. De la misma forma los procesos térmicos utilizados en el experimento, incrementan el efecto pro-oxidante de la fase lipídica [74].

En nuestro estudio (**Publicación 1**), para la preparación de sistemas modelo cárnicos, se utilizaron emulsiones dobles frescas y que por lo tanto presentaban sus propiedades antioxidantes inherentes al tiempo cero de conservación (**Figuras 18-20**).

7.2.1 Capacidad antioxidante de los sistemas modelo cárnicos

En la **Tabla 12** se muestra la capacidad de los sistemas modelo cárnicos estudiados para inhibir el DPPH. La adición de HxT a los sistemas modelo aumenta la capacidad antioxidante aproximadamente un 40% respecto a los sistemas sin HxT ($P < 0,05$), siendo el añadido de forma libre el que demostró la mayor actividad al inicio del periodo de conservación. Es posible que la mayor capacidad antioxidante del HxT libre en esta etapa del periodo se deba a su estructura, aspecto que permitiría al antioxidante situarse en la interfaz lipófila-hidrófila de la membrana lipídica en donde los radicales libres atacan por primera vez; en cambio en las emulsiones, por su propio diseño, se situaría en la parte lipofílica de la membrana celular del tejido cárnico. Nuestros resultados coinciden con autores que han demostrado que el uso de compuestos polifenólicos, reduce la oxidación de productos cárnicos (cerdo, pollo, vacuno, pescado) durante el cocinado y almacenamiento, previniendo así la formación de radicales libres [322].

Después de los primeros 7 días el HxT encapsulado aumenta su capacidad con respecto al libre. Esto podría explicarse en función a que el antioxidante al estar encapsulado, se expresa de forma distinta con respecto al incorporado libremente, que al incrementar su disponibilidad reacciona en mayor proporción al inicio del periodo de conservación. Lo mismo sucede si se comparan los sistemas sin HxT, la capacidad de los compuestos del chía emulsionado se expresan en menor proporción al inicio ya que se encuentran menos disponibles, estabilizados dentro de la emulsión. De acuerdo con Min y cols. [321], la inhibición de radicales libres del DPPH en los sistemas cárnicos no se afecta

de manera importante por los tratamientos térmicos, sin embargo disminuyen significativamente durante el tiempo de conservación. En nuestro análisis se redujo aproximadamente un 90% la capacidad inhibitoria de todos los sistemas al final del tiempo de conservación, no observándose diferencias relevantes ($P<0.05$).

Tabla 12. Porcentaje de inhibición de DPPH en sistemas modelo cárnicos

Sistema modelo	% de inhibición de DPPH (días de conservación)				
	1	7	19	28	39
MB-C	16.88 ± 0.053^{a1}	4.25 ± 0.069^{b1}	1.53 ± 0.026^{c1}	1.98 ± 0.031^{d1}	1.86 ± 0.043^{e1}
MB-LO	24.22 ± 0.106^{a2}	12.31 ± 0.133^{b2}	2.61 ± 0.042^{c2}	2.72 ± 0.098^{c2}	1.42 ± 0.043^{e2}
MB-LO-HxT	39.19 ± 0.058^{a3}	22.58 ± 0.373^{b3}	3.11 ± 0.112^{bc3}	2.18 ± 0.039^{d3}	0.94 ± 0.039^{e3}
MB-WOW	17.7 ± 0.043^{a4}	13.36 ± 0.175^{b4}	1.41 ± 0.038^{c4}	4.62 ± 0.045^{d4}	3.04 ± 0.99^{e4}
MB-WOW-HxT	31.14 ± 0.064^{a5}	29.69 ± 0.064^{b5}	2.84 ± 0.029^{c5}	3.24 ± 0.073^{d5}	1.29 ± 0.022^{e5}

* Diferentes letras en la misma fila (a,b,c) y diferentes números en la misma columna (1,2,3) indican diferencias significativas ($P<0.05$). MB-C, sistema cárnico control; MB-LO, sistema cárnico con aceite de chía no emulsionado; MB-LO-HxT, sistema cárnico con aceite de chía no emulsionado adicionado con hidroxitirosol; MB-WOW, sistema cárnico adicionado con emulsión doble; MB-WOW, sistema cárnico adicionado con emulsión doble e hidroxitirosol encapsulado.

Los productos cárnicos contienen compuestos como carnosina e histidina, que previenen de la oxidación estabilizando y protegiendo las membranas celulares, pero no tienen un papel fundamental en la reducción de iones de hierro. Por lo tanto la concentración de iones en estado oxidado se incrementa a niveles suficientes para favorecer la catálisis de las reacciones de oxidación. Aún en presencia de pequeñas cantidades de hierro, puede producirse lesión oxidativa debido a la potente acción catalítica del mismo. Se asume por tal razón que el efecto pro-oxidante relacionado con los niveles de hierro hemo (oxidado) en los AGP puede llegar a exceder la capacidad de defensa antioxidante del organismo producida por los nutrientes antioxidantes de la carne [321]. Por otro lado, como ya se ha demostrado, la cantidad de polifenoles del aceite de chía disminuye durante el tiempo de almacenamiento, lo que puede influir aparentemente en este desbalance de la capacidad antioxidante/pro-oxidante.

Los valores de la peroxidación lipídica de los sistemas cárnicos se muestran en la **Figura 21**. Éstos se ven afectados por las distintas formulaciones. Como puede observarse, de todas las muestras, el sistema cárnico con el aceite de chía es el que presenta los valores de TBARS más elevados con respecto al control. Los sistemas cárnicos adicionados con aceite de chía son ricos en AGP, particularmente ALA, los cuales son muy sensibles a la peroxidación [72].

Los resultados del análisis en los sistemas reformulados con emulsiones múltiples indican que la peroxidación fue aproximadamente un 40% menor con respecto a los sistemas con la fracción lipídica libre ($P < 0,05$). Esto puede explicarse debido a que el aceite, al encontrarse estabilizado dentro de la emulsión, es menos susceptible a la descomposición por no estar expuesto al medio [29], lo cual favorece la estabilidad con respecto al tiempo.

Los sistemas cárnicos son susceptibles de oxidación, lo cual puede ser explicado si se toman en cuenta diversos factores asociados con la composición y el proceso de elaboración. El proceso de homogenización de la mezcla propicia que el tamaño de partícula de los componentes se reduzca y a su vez se incrementa la exposición y accesibilidad de los compuestos reactivos con el oxígeno (compuestos oxidables) [323]. La influencia del tratamiento térmico también es considerada. Como bien se sabe, los procesos de calentamiento favorecen la oxidación de la fracción lipídica. Para este experimento la temperatura empleada en el proceso de cocción (70°C) es suficiente para acelerar el proceso de descomposición de los AGP, incluso en el corto periodo del tratamiento [73,321,324].

El HxT, tanto libre como encapsulado en la emulsión, al ser un buen antioxidante, demostró valores más bajos de peróxidos expresados como MDA. En ambos casos los sistemas con HxT adicionado disminuyeron más del 50% la peroxidación lipídica ($P < 0,05$). Por otra parte la carne también contiene de manera natural compuestos con actividad antioxidante, entre ellos la carnosina, anserina e histidina [321,325]. Así pues, tras la liberación de este tipo de compuestos al medio, sumado el efecto protector del HxT, es

posible que se logre mantener una relativa estabilidad de los sistemas. Por lo tanto, durante el tiempo de conservación, la capacidad de descomposición del perfil de ácidos grasos se mantiene con diferencias significativas menores al 15% ($P < 0,05$).

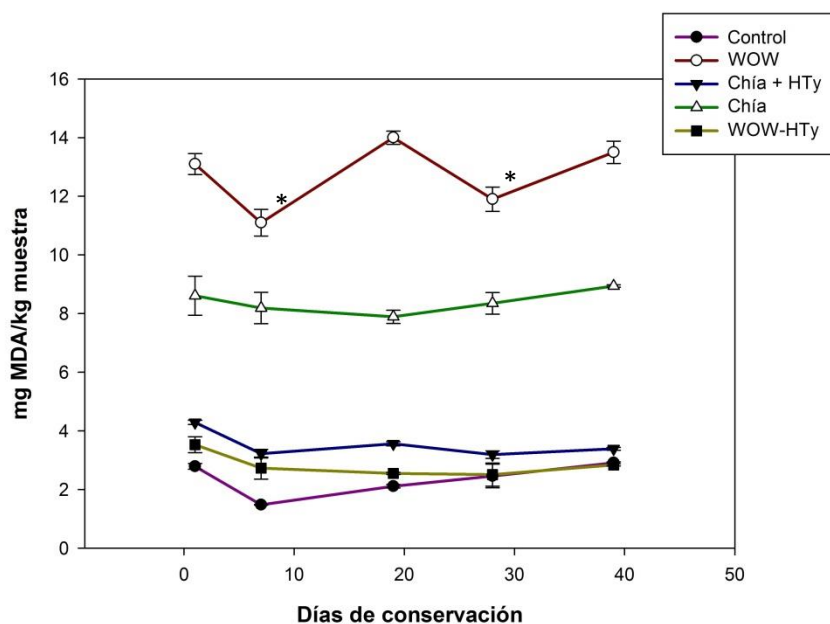


Figura 21. Peroxidación lipídica (TBARS) en los sistemas modelo cárnicos (*, $P < 0,05$).

7.3 Impacto del consumo de las dietas experimentales conteniendo cárnicos funcionales

Este estudio exploró, por primera vez, los efectos de la ingesta de cárnicos enriquecidos con aceite de chía, HxT o silicio en ratas envejecidas como parte de un modelo de NASH.

7.3.1 Efecto del consumo de las dietas experimentales sobre la ingesta y el peso corporal

El consumo de dieta conteniendo los cárnicos control sugiere una buena aceptación por la rata de 1 año, si lo comparamos con el de otros datos de la bibliografía o de animales más jóvenes estudiados por nuestro grupo. La dieta control contenía importantes cantidades de AGS, los cuales son muy palatables [326,327], aspecto que en principio condicionaría una mayor ingesta; sin embargo, cuando las dietas son hipercalóricas el consumo de las mismas es menor en cantidad respecto al de dietas con una menor densidad energética [328]. El aporte elevado de energía y grasa saturada afectó al peso corporal, el cual fue elevado, sugiriendo que la dieta control induce cierto grado de sobrepeso/obesidad en las ratas Wistar de 1 año de edad objeto de estudio, lo que a su vez está relacionado con la

inducción de NASH, que discutiremos más adelante (**Publicaciones 6 y 7**). Cossio-Bolaños y cols. [329] han publicado curvas de crecimiento percentiladas en ratas Wistar macho donde se observa que el crecimiento es activo hasta la semana 14, tendiendo posteriormente a estabilizarse. Por extrapolación de estas curvas, a la semana 60 sugeriría que la mediana del peso (percentil 50) de estas ratas rondaría alrededor de 600g, valor ligeramente más bajo que la media de las ratas del grupo control.

La incorporación de colesterol en las dietas experimentales redujo significativamente el peso corporal de los grupos CHIA, HxT y Si, en comparación con el grupo C. Estos resultados no se relacionan con los valores registrados para la ingesta total de estos grupos, donde no se aprecian diferencias significativas entre estos. De acuerdo con Beynen y cols. [330], la ingesta de una dieta rica en colesterol induce un menor peso corporal. Una menor ingesta de dieta se observó en estudios previos de ratas alimentadas con cárnicos enriquecidos con algas marinas [283], sin embargo Nesic y cols. [304], atribuyen esta disminución al efecto anoréxico de la edad [331]. Resultados previos de nuestro grupo sugieren un efecto altamente lipolítico de la ingesta de colesterol, mecanismo asociado con la expresión de la hormona sensible lipasa (HSL), la cual es una enzima responsable de la disminución de grasa corporal y del tejido adiposo [332]. De hecho, el peso final de las ratas de los grupos HC, CHIA y Si ronda el valor del percentil 10 que podría obtenerse por extrapolación de las curvas propuestas por Cossio-Bolaños y cols. [329].

El peso corporal entre los grupos alimentados con colesterol fue significativamente menor en el grupo HxT, lo que sugiere que este ingrediente funcional puede exacerbar el efecto comentado del colesterol dietético sobre la grasa del tejido adiposo y la expresión enzimática de enzimas lipogénicas/lipolíticas. Sin embargo, como no se observaron diferencias en la ingesta entre los grupos experimentales consumiendo dietas enriquecidas en colesterol, los resultados deben atribuirse a otros hechos metabólicos, como el efecto termogénico promovido por el HxT. Algunos polifenoles aumentan la secreción de noradrenalina y adrenalina y su interacción con los receptores $\beta 3$ del tejido adiposo marrón originado incremento de la expresión génica de la UCP1 o termogenina

[333]. Estos aspectos frenan la acumulación de grasa corporal y disminuye el peso del tejido adiposo a través de un aumento en el catabolismo de triglicéridos según lo informado por Oi-Kano y cols. [334].

7.3.2 Efecto de la ingesta de las dietas experimentales sobre los mecanismos de defensa antioxidante

El proceso de envejecimiento induce cambios en varios elementos del sistema antioxidante endógeno [233]. Entre muchos factores, los componentes de la dieta pueden afectar directamente a los mecanismos de defensa que protegen contra el estrés oxidativo, llevando a una modificación en los niveles de antioxidantes no enzimáticos (por ejemplo, niveles de glutathione) y de las vías enzimáticas. Estudios previos han demostrado que el GSH disminuye con la edad, mientras que el GSSG y/o el cociente GSSG/GSH tienden a ser más elevados [233]. Otros estudios han sugerido que los niveles elevados de grasas saturadas en la dieta conducen a una alta peroxidación lipídica modificando indirectamente los niveles de GSH y la actividad de la enzima glutathione reductase [283,335]. Nuestros resultados muestran que los niveles de GSH fueron significativamente más bajos que los de GSSG independientemente de la dieta administrada. Se ha demostrado que la grasa dietética y la hipercolesterolemia afectan la integridad de la membrana celular, reduciendo así la defensa contra el daño oxidativo [336] y por lo que la inclusión exógena de antioxidantes puede no ser suficiente para revertir los efectos negativos del envejecimiento (**Publicaciones 2 y 3**).

En el grupo HC, los niveles de GSSG se incrementan significativamente. Este efecto ha sido expuesto por nuestro grupo en diferentes publicaciones, demostrando que la inducción hipercolesterolemia aumenta la peroxidación [283,337,338]. Las dietas CHIA, HxT y Si mejoraron el índice redox con respecto al grupo HC, aunque el mecanismo involucrado parece ser diferente para cada ingrediente, ya que CHIA presentó niveles de GSH más altos, mientras que HxT y Si redujeron los niveles de GSH y GSSG a valores similares que el grupo C. Schultz y cols. [283] observaron que la inclusión de wakame en cárnicos en el marco de dietas enriquecidas en colesterol reducía el índice redox a través

de incrementar la concentración de GSH, recordando lo observado en el grupo de CHIA. La incorporación de aceite de chía, HxT o Si en las dietas, en comparación con el grupo HC, en el marco de un modelo NASH redujo el daño oxidativo mediante la regulación de los niveles de GSSG a través de aumento de GR y disminución de los niveles de proteína GPx.

Cuando se realizaron correlaciones de los parámetros en los grupos C y HC, se encontró una correlación positiva entre las actividades enzimáticas de SOD vs. CAT ($r=0,910$, $P<0,01$), lo que podría significar que el peróxido de hidrógeno producido por SOD fue eliminado principalmente por CAT; de hecho, se encontró una correlación negativa entre la actividad de CAT y los niveles de GSSG ($r=-0,715$; $P<0,01$). Por otra parte, el índice redox aumentó debido a una reducción significativa en los niveles de la expresión de GR, lo que sugiere que la inclusión de colesterol en la dieta afecta más el índice redox, agravando los cambios relacionados con la edad [233,338].

La incorporación de Si, aceite de chía o HxT en la dieta redujo el daño oxidativo en este modelo NASH. La dieta Si indujo la mayor actividad de SOD y expresión de Mn-SOD y CuZn-SOD, pero redujo los niveles proteicos de SOD. Estos resultados podrían explicarse, al menos parcialmente, porque un aumento de la actividad enzimática es suficiente para reducir el daño oxidativo, siendo innecesaria la síntesis de más proteínas. El aumento de la actividad SOD conduciría a mayores niveles de peróxido de hidrógeno, pero sin afectar la actividad de CAT o GPx. En consonancia con esta afirmación, la ingesta, la absorción neta y el contenido de Si en hígado se correlacionaron positivamente con la actividad SOD total y las expresiones Mn-SOD y CuZn-SOD, pero negativamente con el nivel de proteína GPx. Por lo tanto, podría ser necesario un mecanismo alternativo para eliminar el peróxido de hidrógeno producido. Debido a que el índice redox se mantuvo a niveles similares a C en el grupo de Si y se encontró una correlación negativa entre la actividad SOD frente a GSSG ($r=-0,956$; $P<0,01$), puede sugerirse que el Si neutraliza el daño oxidativo causado por el colesterol mediante la eliminación del peróxido de hidrógeno, siendo en consecuencia innecesaria la sobreexpresión de CAT o GPx. Resultados similares fueron observados por Vidé y cols. [339] quienes encontraron que las actividades de SOD y GPx mejoraban después de la ingesta de Si, en el marco de una dieta rica en grasas. Sin embargo, esta

inducción no impidió la acumulación hepática de ROS, lo que sugiere que la activación GPx no era el principal mecanismo para prevenir el daño oxidativo. Las diferencias entre los resultados de Vidé y cols. [339] y los de esta Tesis Doctoral pueden deberse a la diferente composición de la dieta, que causa diferente grado de daño hepático, pero también al contenido de Si, que fue mayor en nuestro estudio y que ha demostrado capacidad de capturar el peróxido de hidrógeno en cultivos celulares [280,340] (**Figura 22**).

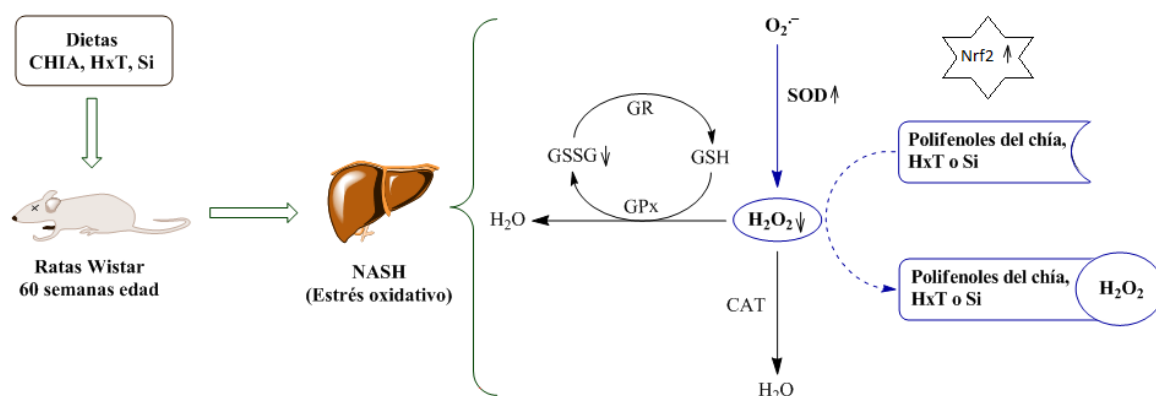


Figura 22. Efecto de las dietas experimentales sobre los mecanismos de defensa antioxidante. GSH, glutatión reducido; GSSG, glutatión oxidado; GR, glutatión reductasa; GPx, glutatión peroxidasa; SOD, superóxido dismutasa; CAT, catalasa; Nrf2, factor nuclear similar a 2-(derivado de eritroide-2).

Con respecto a las ratas de los grupos HxT y CHIA, la SOD aumentó significativamente con respecto a HC, aunque sin alcanzar los niveles del grupo Si. En el grupo de HxT, los valores de SOD no se correlacionaron con los de CAT o GPx, lo que sugiere que este compuesto podría ejercer un efecto similar al de Si en relación con la neutralización de peróxido de hidrógeno. La capacidad del HxT para eliminar el peróxido de hidrógeno fue propuesta previamente por Manna y cols. [341]. Del mismo modo, los niveles de CAT fueron significativamente mayores respecto a las ratas del grupo Si, pero la actividad no se modificó. Por otra parte, los animales HxT mostraron significativamente niveles mayores de GR y GPx que sus homólogos de Si. En el caso del grupo CHIA, observamos una menor activación, probablemente por una menor producción de radicales libres a través de una menor actividad de las enzimas ciclooxygenasa-2 y 5-lipoxigenasa como se ha descrito para AGP omega-3 [342,343] (**Figura 23**). Pero también por la capacidad antioxidante de los compuestos fenólicos del aceite de chía [40,65,66].

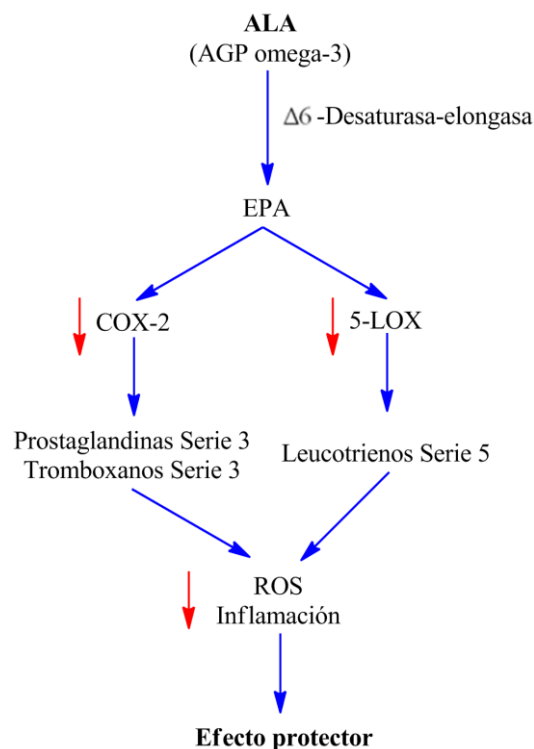


Figura 23. Mecanismo propuesto del efecto protector de los ácidos grasos omega-3. Los ácidos grasos de la familia omega-3, en comparación con los de la familia omega-6, son débiles sustratos para la actividad de ciclooxigenasa-2 (COX-2) y 5-lipoxigenasa (5-LOX), generando productos menos activos y, en consecuencia, menor respuesta inflamatoria y una disminución en la cantidad de especies reactivas de oxígeno (ROS). ALA, ácido α -linolénico; AGP, ácidos grasos poliinsaturados; EPA, ácido eicosapentaenoico.

El factor Nrf2 es un componente clave en la homeostasis celular del sistema redox, implicado en la atenuación de los procesos de estrés oxidativo. Su activación está relacionada con la síntesis de GSH, el metabolismo lipídico y la inflamación [234,344]. Además, los niveles de Nrf2 disminuyen con la edad [345]. En un estudio de microarrays por Yates y cols. [346] demostraron que la activación de Nrf2 reprime la expresión de enzimas clave involucradas en la síntesis de ácidos grasos, con la consiguiente reducción de los niveles de lípidos hepáticos mediante la inhibición de la lipogénesis y promoción de la oxidación de ácidos grasos [347]. En nuestro experimento, la expresión de Nrf2 se redujo significativamente por la ingesta de colesterol, lo cual podría estar relacionado con la menor actividad de CAT. Nuestros hallazgos sugieren que el aceite de chía, HxT (en menor proporción) y Si, son estímulos exógenos que promueven la activación de Nrf2 para limitar la respuesta pro-oxidativa al colesterol de la dieta y el envejecimiento. Estudios previos han enfatizado en el papel del Nrf2 en la progresión de NASH, demostrando que

ratones alimentados con una dieta de alto contenido en colesterol mostraron cambios en la expresión de este factor relacionados con variaciones en los marcadores de esteatohepatitis [348]. Como se discutirá más adelante (**Publicaciones 6 y 7**), la inclusión de chía, HxT y Si en las dietas experimentales reducen la progresión de NASH a NAFLD, probablemente debido, entre otros factores, a la activación del Nrf2.

7.3.3 Efecto de la ingesta de las dietas experimentales sobre el metabolismo lipoproteico

Los resultados de esta Memoria de Tesis Doctoral proporcionan información novedosa sobre el papel del aceite de chía, HxT y Si en la reducción de los efectos negativos de las dietas enriquecidas con colesterol y grasas saturadas sobre el metabolismo lipoproteico (**Publicaciones 4 y 5**). Este estudio también tiene la virtud de ser el primero en describir dichos efectos en ratas de un año de edad.

Junto con el aumento de colesterol en sangre relacionado con la edad [349,350], las ratas del grupo C también presentaron en plasma concentraciones relativamente más elevadas de fosfolípidos que ratas Wistar jóvenes [219,227,330]. De hecho, el 37,5% de los animales del grupo C presentó hipercolesterolemia en base al punto de corte utilizado para definir este estado en ratas [219]. Sin embargo, la trigliceridemia de los animales control fue normal y concordante a lo encontrado en otras publicaciones de nuestro grupo en ratas jóvenes [219,227], lo que señala que el enriquecimiento en AGS de la dieta afecta preferentemente a los niveles de colesterol y de las lipoproteínas que lo transportan [215].

Las ratas C presentaron un perfil típico de lipoproteínas de ratas con niveles reducidos de LDL y elevados de HDL [219,227,291,330]. El modelo experimental de rata se define como un modelo HDL, mostrando una captación muy efectiva de VLDL a través de la activación del *Ldlr* y una baja transferencia de apoB de VLDL a LDL [351,352]. Sin embargo, la expresión de *Ldlr* baja se ha asociado con el envejecimiento [353], lo que explicaría al menos parcialmente la contribución de la fracción IDL+LDL a los lípidos plasmáticos totales en ratas C (**Figura 24**).

Coincidiendo con los estudios de Uchida y cols. [350], los niveles de la fracción de VLDL aumentaron en ratas HC, probablemente relacionadas con su baja expresión de *Ldlr*, agravando la situación observada en las ratas C envejecidas. La reducción de la masa total de HDL en ratas HC fue consistente con los resultados previos en ratas hipercolesterolémicas [227,228], probablemente asociadas a la captación de HDL por el receptor *scavenger* B-1 (SRB1) para aumentar la excreción de colesterol a través de la bilis [354].

Los tres ingredientes alteraron parcialmente los efectos inducidos por la ingesta de colesterol, normalizando la composición de las VLDL. Se observaron incrementos en los niveles de colesterol plasmático para todos los grupos alimentados con colesterol. En el grupo CHIA se redujo el efecto hipercolesterolemizante de la dieta observado en el grupo de HC, llevando los niveles plasmáticos a los del grupo C. El aceite de chía se ha descrito como regulador de la colesterolemia debido al efecto de los AGP en el metabolismo lipídico [36,355]. Olmedilla-Alonso y cols. [356] encontraron que el consumo de productos cárnicos enriquecidos con nueces (ricas en ALA) disminuían los niveles de colesterol en individuos con riesgo de ECV. Por su parte, la dieta de Si redujo de forma similar a CHIA el efecto hipercolesterolémico al llevar los niveles plasmáticos a valores similares a los de la dieta C. El silicio se ha descrito como un agente anti-ateromatoso gracias a un mecanismo que inhibe la acumulación de lípidos en el tejido del endotelio vascular. Por lo tanto, tiene un efecto sobre el metabolismo del colesterol total del plasma, pero no en la síntesis de lípidos hepáticos [349]. El grupo HxT también presentó una tendencia a reducir la colesterolemia, comparada con el HC. Fki y cols. [357] observaron una tendencia similar para la colesterolemia en ratas alimentadas con dietas enriquecidas con colesterol e HxT. Este efecto puede ser explicado con los efectos antioxidantes y anti-aterogénicos descritos para este polifenol [77,357].

La administración de colesterol en la dieta aumentó los niveles totales de lípidos y colesterol (19% y 32%, respectivamente). Además, la prueba de contingencia mostró diferencias significativas entre las ratas hiper- y normo-colesterolémicas en los grupos HC y C, ya que todas las ratas HC fueron moderadamente hipercolesterolémicas (>2,59

mmol/L). Sin embargo, el aumento registrado en la colesterolemia (0,8 mmol/L) fue menor de lo esperado a la luz de estudios previos de nuestro grupo en animales jóvenes desde se evaluaron los efectos de la adición de colesterol y ácido cólico a la dieta [227,283,358]. Erdinçler y cols. [349] también observaron un aumento pequeño, pero significativo, en el colesterol plasmático de ratas envejecidas alimentadas con cantidades similares de colesterol a las de las dietas experimentales.

Los niveles y la composición de lipoproteínas sugieren un incremento de colesterol-VLDL en ratas HC respecto a sus homólogas C. La fracción IDL+LDL también fue más rica en colesterol y más pobre en triglicéridos. Además, el contenido de proteína de esta fracción fue más elevado, lo que sugiere un mayor número de partículas IDL+LDL en plasma. Vázquez Velasco y cols. [228] encontraron en ratas fa/fa alimentadas con colesterol un incremento de las IDL+LDL. Nuestros resultados coinciden con otras publicaciones que informan de la presencia de VLDL enriquecidas en colesterol (β -VLDL), las cuales se consideran aterogénicas para la rata [359,360]. Se puede sugerir una disminución en el número de partículas de HDL, ya que su composición se mantuvo sin cambios, pero su masa total disminuyó (**Figura 24**).

La inclusión de CHIA y Si bloqueó parcialmente el efecto hiperlipemiante del colesterol dietético, reduciendo significativamente la colesterolemia, trigliceridemia, fosfolipemia y lipemia total respecto a lo observado en el grupo HC. Por su parte el HxT produjo estos efectos excepto que no manifestó acción sobre colesterol. Estos resultados son consistentes con estudios previos donde se evaluó el efecto de la chía sobre parámetros lipídicos en ratas [361]. La reducción de HDL también se observó previamente en ratas que consumieron aceite de chía durante 4 semanas [362]. Existe evidencia que altas concentraciones de ácidos grasos presentes en el aceite de chía, como ALA, reducen los niveles de VLDL y triglicéridos [43]. Por lo tanto, puede sugerirse la hipótesis de que CHIA, HxT y Si reducirían triglicéridos, fosfolípidos y por lo tanto también VLDL, al aumentar la disponibilidad de ácidos grasos para la esterificación del colesterol hepático [230]. No obstante, la inclusión de Si en la dieta eleva de manera significativa la expresión del *Ldlr*, explicando su mayor capacidad hipocolesterolemia, respecto CHIA e HxT,

contribuyendo de forma más importante a reducir la colesterolemia. Esta misma teoría se puede aplicar para el grupo de Si; estudios previos demuestran que la expresión de ACAT reduce la concentración de colesterol libre del hígado y aumenta la concentración de ésteres de colesterol como estrategia para mejorar los niveles de *Ldlr* [363]. Sin embargo, Peluso y Schneemann [146] encontraron que el Si ejerció efectos hipocolesterolémicos pero no hipertrigliceridémicos en ratas jóvenes alimentadas con colesterol al 1%.

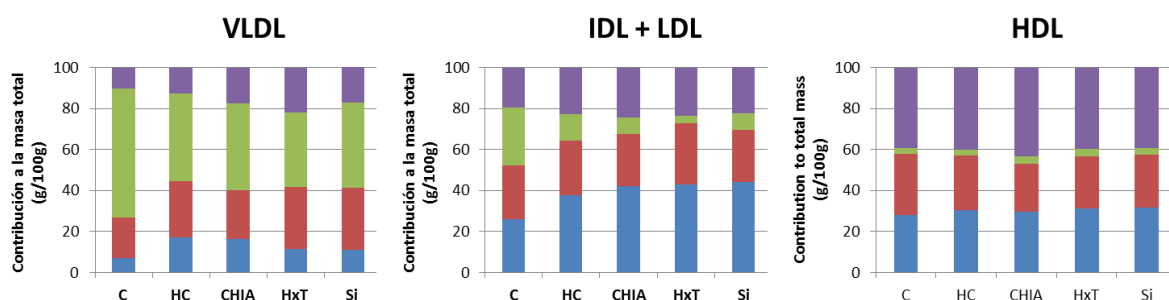


Figura 24. Porcentaje de contribución de proteína y componentes lipídicos a la masa total de las diferentes lipoproteínas. VLDL, lipoproteína de muy baja densidad; IDL, lipoproteína de densidad intermedia; LDL, lipoproteína de baja densidad; HDL, lipoproteína de alta densidad; C, grupo de RP-control; HC, grupo de RP-enriquecido con colesterol; CHIA, grupo de RP-enriquecido con aceite de chia; HxT, grupo de RP-enriquecido con hidroxitiroso; Si, grupo de RP-enriquecido con silicio.

El CHIA o HxT no aumentaron la expresión *Ldlr* (**Publicación 5**). Este resultado puede deberse a que afectarían en menor cuantía al *pool* de colesterol libre. Como se ha comentado, el mecanismo para reducir los niveles plasmáticos de lipoproteínas aterogénicas es a través de la esterificación de colesterol libre por la enzima ACAT, utilizando de manera incrementada los AGL del plasma. Como se discutirá en el **apartado 7.3.4**, en el grupo de Si la relación de los AGL hepáticos/AGL en plasma es la más elevada, que explica lo anterior. No obstante, el *pool* de colesterol libre también se modularía a través de la transformación del colesterol en ácido cólico para ser excretado por la bilis [230,364,365]. Puede sugerirse que el efecto reductor de colesterol en plasma y de las β -VLDL en el caso de CHIA e HxT sea a través de reducir la expresión génica de la apoB100 y del contenido en triglicéridos y colesterol de las VLDL. Es conocido que los ácidos grasos de la familia omega-3 aumentan la β -oxidación hepática, reduciendo su disponibilidad para incorporarlos a las VLDL [366].

Al igual que en las ratas HC, la fracción de VLDL en ratas Si, CHIA o HxT era rica en colesterol. Sin embargo, los grupos registraron niveles mucho más bajos de proteína y masa total de VLDL, lo que sugiere una clara reducción en el número de partículas de VLDL. Este mecanismo no está completamente descrito, pero parece implicar una reducción en la disponibilidad de triglicéridos hepáticos y metabolismo proteico, que recuerda al mecanismo hipotrigliceridémico propuesto para los ácidos grasos omega-3 [366,367].

7.3.4 Efecto de la ingesta de las dietas experimentales sobre la lipogénesis y oxidación de ácidos grasos en hígado

La proteína AMPK es un modulador clave en el balance energético a nivel celular [14]. Esta proteína se activa en respuesta a un aumento del cociente AMP/ATP dentro de la célula. Su activación puede ser considerada como un indicador de la situación metabólica, y muy relacionada con el estatus nutricional y la utilización de los componentes energéticos de la dieta. Estudios previos han demostrado que su expresión puede ser suprimida tras la ingesta de dietas ricas en grasas saturadas [43, 44]. A pesar de que las ratas de nuestro experimento tienen 60 semanas de edad en el momento del sacrificio y consumen una importante cantidad de AGS, los niveles de adiponectina y leptina se corresponden con los de ratas control [368,369]. También el cociente adiponectina/leptina (23,85), bastante elevado, hace presuponer que la actividad AMPK no debe estar afectada. Los niveles de insulina señalan que aunque las ratas no presentan hiperinsulinemia, ya que la media es menor del punto de corte (15 mU/L), los niveles medios de glucosa (127.4 mg/dL) rondan el punto de corte entre pre-diabetes y diabetes, lo que justificaría la idea de que las ratas del grupo C se encuentran en un estado inicial de NASH.

Cuando las ratas ingieren la dieta rica en grasas saturadas junto con el agente hipecolesterolemizante la situación cambia de forma muy marcada. Así en las ratas del grupo HC, los niveles de adiponectina se reducen aproximadamente 28%, mientras que la leptina se eleva más de 7 veces respecto a los niveles del grupo C. Por otro lado, los niveles de insulina (20,3 mU/L) manifiestan la existencia de hiperinsulinemia, que a pesar

del incremento en la expresión de los receptores de esta hormona no son capaces de mantener la glucemia, elevándose esta un 32% respecto a C. Estos datos, junto con los de HOMA-IR, sugieren la existencia de una marcada resistencia a la insulina. La bibliografía es uniforme señalando que en situación de resistencia a la insulina se produce un incremento del vertido de ácidos grasos libres al plasma como consecuencia de la pérdida de la actividad inhibidora de la insulina sobre la enzima HSL [332]. Los datos de la **Publicación 6**, señalan una elevación significativa del 25% en plasma de los niveles de ácidos grasos libres, reafirmando la idea de que la conjunción AGS/colesterol/edad induce resistencia a la insulina en ratas Wistar. De hecho, en el estudio histológico encontramos que el 100% de las ratas HC presentan, según el score NAS, desarrollo definitivo de NASH.

Teniendo en cuenta estas consideraciones previas, podemos intuir que la activación de AMPK debe estar reducida, y con ello la β -oxidación de ácidos grasos. Esta situación puede estar contrabalanceada con la activación de la lipogénesis vía SREBP-1c. Como hemos discutido en el apartado de lipoproteínas (**7.3.3**), el mantenimiento activo de receptores apoE/apoB100 requiere reducir los niveles hepáticos de colesterol libre mediante esterificación con ácidos grasos, los cuales procederían del tejido adiposo y explicarían la reducción del peso corporal y del contenido de grasa de estas ratas [352,364]. Esta situación requiere un equilibrio entre los mecanismos inductores de la lipogénesis y reductores de la β -oxidación de ácidos grasos.

Los datos demuestran que en el grupo HC se reduce más del 30% la relación pAMPK/AMPK con respecto al grupo C (**Publicaciones 6-7**), lo que da lugar a una disminución significativa de la expresión de PPAR α y del CPT-1a, ambos implicados en la vía de la oxidación de ácidos grasos, lo que reafirma las consideraciones planteadas anteriormente. De forma paralela, en relación con la activación de la vía lipogénica, dependientes del estatus insulinémico y glucémico, encontramos elevaciones significativas del SREBP-1c, pero no de PPAR γ , ChREBP. Además, se observa una inhibición de la actividad de ACC, dado por el cociente pACC/ACC, que puede resultar paradójica. Sin embargo, se ha señalado que la elevación de la expresión génica del SREBP-1c se produce

como consecuencia de la reducción del *pool* de colesterol libre hepático, el cual a su vez dependería de la disponibilidad de ácidos grasos libres hepáticos [363,370]. Viejo y cols. [230] encontraron un incremento marcado en los ésteres de colesterol hepático en ratas a las que se les administró dietas ricas en colesterol. Estos autores sugirieron que esta esterificación se produciría como mecanismo para mantener reducidos los niveles de colesterol libre, intentando así mantener los niveles de la expresión del *Ldlr*. Todas estas consideraciones concuerdan con el incremento observado en la expresión del SREBP-1c en las ratas del grupo HC.

Cuando se compararon las dietas conteniendo los ingredientes funcionales con las de las ratas HC nos encontramos con una elevación marcada de adiponectina en los tres grupos, particularmente en CHIA. Como es conocido, la adiponectina es una hormona producida por el tejido adiposo cuya funcionalidad es reducir la resistencia a la insulina [371]. Por otro lado, los niveles de leptina, hormona promueve la resistencia a la insulina, se redujeron aproximadamente un 40%. El cociente adiponectina/leptina se incrementa al menos tres veces, lo que podría sugerir que la inclusión de CHIA, y Si en los cárnicos funcionales produce una clara mejoría del estado insulinémico. Efectivamente, esta hipótesis se comprueba porque estos grupos reducen la insulinemia y el HOMA-IR aproximadamente un 20%. No obstante, a pesar de esta mejoría, los niveles de glucosa permanecen elevados, e incluso tienden a ser mayores en el grupo HxT, posiblemente debido a una reducción significativa (aproximadamente el 40%) de la expresión de los receptores de insulina en este grupo.

La reducción significativa de la expresión de AMPK en el grupo HC, se revierte en los grupos de CHIA e HxT a valores similares a los del grupo C, no produciéndose esa situación en el grupo Si. Como consecuencia de la activación de la AMPK, la expresión de CPT-1a se incrementa, lo que conduciría a una elevación del proceso de oxidación de ácidos grasos. Hemos señalado en el apartado de lipoproteínas (**7.3.3**) que por distintos mecanismos el HxT promueve el incremento de la termogénesis con reducción de la cantidad de grasa [372], lo cual genera de manera indirecta un ligero efecto sobre los marcadores de β -oxidación. Sin embargo, el grupo CHIA, por efecto de sus AGP omega-3

incrementa los mecanismos de β -oxidación [366,373]. Esto sugiere que la cantidad de ácidos grasos disponibles para la síntesis de triglicéridos es menor, manifestándose en cambios positivos en el score NAS. De hecho, en el grupo CHIA, solo un 12.5% de las ratas permanecen en situación de NASH definitivo, mientras que en el grupo HxT es del 50%. Este efecto no es observado en el grupo Si, en donde un 75% de las ratas son clasificadas como NASH definitivo. Puede por tanto especularse, que en este grupo la disponibilidad de ácidos grasos libres hepáticos se destina fundamentalmente para esterificación del colesterol, a través de la activación de la enzima ACAT [352,364], reduciéndose la disponibilidad de los mismos para la lipogénesis. Este efecto elevaría la expresión génica del *Ldlr*, repercutiendo positivamente en los niveles plasmáticos de colesterol y reduciendo la expresión de PPAR γ , ACC y FASN [365,374] (**Figura 25**).

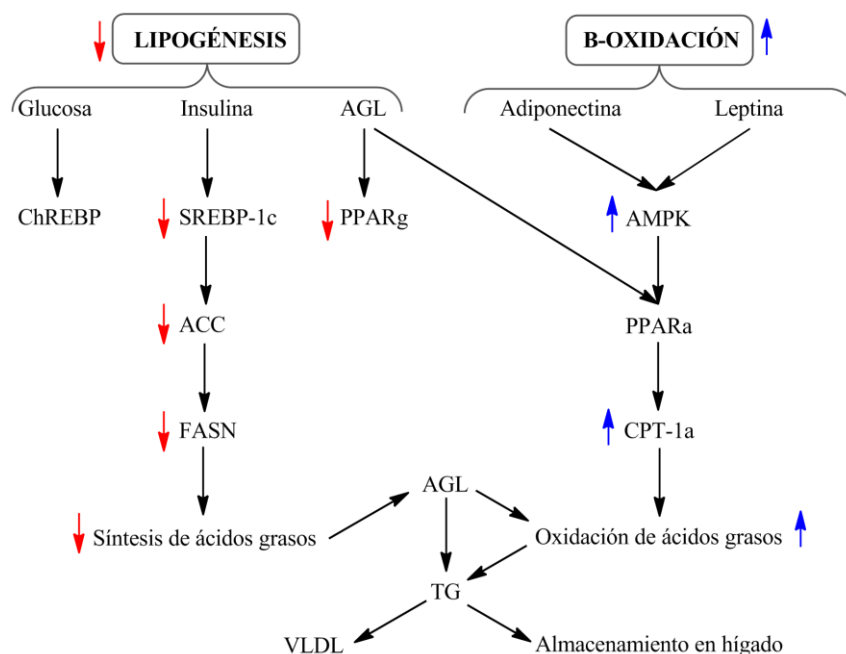


Figura 25. Efecto de las dietas experimentales sobre la vía de lipogénesis y β -oxidación de ácidos grasos. AGl, ácidos grasos libres; ACC, acetil coenzima A carboxilasa; AMPK, proteína quinasa activada por AMP; ChREBP, proteína de unión al elemento de respuesta de carbohidratos; CPT-1 α , carnitina palmitoiltransferasa 1a; FASN, ácido graso sintetasa; PPAR α y PPAR γ , receptor activado por proliferador de peroxisoma alfa y gamma; SREBP-1c, proteína de unión al elemento regulador del esterol 1c; TG, triglicéridos; VLDL, lipoproteína de muy baja densidad. Las flechas rojas indican el efecto de Si, mientras que las azules el de los grupos CHIA e HxT.

Los resultados muestran la necesidad de diferenciar entre el origen de la esteatosis provocada, por acúmulo de esteres de colesterol, de triglicéridos o de ambos factores. Esto ayudaría a discernir el origen del grado de la esteatosis encontrada, que es máxima en los tres grupos y equivalente a la del lote HC. Sin embargo, considerando los otros parámetros histopatológicos del hígado, observamos que el grupo CHIA obtuvo un menor desarrollo de NASH, seguido por el Si donde se observó menor balonización hepatocelular e inflamación lobular que en el grupo HxT. No obstante, el grupo HxT presentó el menor score NAS medio, seguido de Si y CHIA.

VIII. RESUMEN Y CONCLUSIONES

VIII. RESUMEN Y CONCLUSIONES

En esta memoria de Tesis Doctoral se ha procedido a estudiar la estabilidad de las emulsiones dobles utilizando como fase oleosa el aceite de chía e incorporando hidroxitirosol encapsulado en la fase interna acuosa. Posteriormente estas emulsiones se han agregado a un sistema modelo cárnico a fin de evaluar la capacidad de las emulsiones para mejorar el perfil antioxidante y conocer si son una opción viable para alargar la vida útil de un producto cárnico con un perfil graso mejorado, pero potencialmente más peroxidable. Por último se procedió a estudiar la viabilidad de la utilización de derivados cárnicos potencialmente funcionales conteniendo tres tipos diferentes de ingredientes, aceite de chía, hidroxitirosol y silicio en ratas envejecidas, para conocer los efectos sobre diferentes aspectos del metabolismo lipoproteico, estrés oxidativo, resistencia a la insulina, y equilibrio lipogenético/lipolítico hepático que pudieran influir en el desarrollo de esteatosis hepática.

Se realizaron estudios *in vitro* e *in vivo*. En los estudios *in vitro* se evaluaron las características físicas, estabilidad y la capacidad antioxidante y estado de peroxidación lipídica de las emulsiones y sistemas modelo cárnicos. En los estudios *in vivo* se emplearon ratas Wistar macho de 60 semanas de edad que se mantuvieron siguiendo los criterios éticos para la protección de animales de investigación científica. La dieta control (C), preparada a partir de la dieta semi-sintética modificada, sin colesterol añadido, a la que se incorpora el cárnico control sin enriquecer; la dieta control hipercolesterolemia (HC), elaborada como la dieta C pero en este caso parte del almidón de maíz fue reemplazado por 1.26% de colesterol y 0.25% de ácido cólico; las dietas hipercolesterolemias con cárnicos enriquecidos con HxT, aceite de chía o silicio (HxT, CHIA, Si), similares a HC, pero que incorporan dentro del cárnico alguno de estos tres compuestos. Se evaluaron el estado de defensa antioxidante, los marcadores del metabolismo lipídico y resistencia a la insulina, y el perfil lipoproteico.

Los resultados obtenidos permiten emitir las siguientes **conclusiones**:

A. Sobre las emulsiones y sistemas modelo cárnicos:

1. Las emulsiones múltiples proporcionan nuevas formas de incorporar ingredientes funcionales en los alimentos.
2. Las emulsiones $W_1/O/W_2$ preparadas con aceite de chía tenían buena estabilidad y una estructura homogénea, mientras que las que contenían HxT mostraron una buena capacidad antioxidante en los primeros días de almacenamiento.
3. La presencia de aceite de chía, promueve la oxidación de lípidos en masas de carne cocidas. Sin embargo, este aceite es más susceptible a la oxidación cuando se incorpora emulsionado que cuando se añade en forma líquida.
4. El hidroxitirosol demostró capacidad antioxidante, siendo menos efectivo cuando se incluyó en la fase acuosa interna de la emulsión.

B. Sobre los sistemas *in vivo*

1. La incorporación de hidroxitirosol, aceite de chía y silicio en matrices cárnicas es una estrategia tecnológica y nutricional eficaz para asegurar el aporte dietético de ingredientes, con efectos potencialmente beneficiosos para la salud, transformando los cárnicos en alimentos funcionales.
2. La ingesta de derivados cárnicos incluidos en una dieta con un alto contenido en colesterol y grasas saturadas produce los efectos típicos de NASH: aumento de los niveles de colesterol, tamaño y peso del hígado, esteatosis, inflamación, estrés oxidativo y resistencia a la insulina.
3. La incorporación de aceite de chía, hidroxitirosol o silicio en los cárnicos bloquea parcialmente los efectos negativos del colesterol dietético, reduciendo los efectos prooxidantes, hiperlipemiantes, y elevadores de resistencia a la insulina, así como de la progresión de NAFLD a NASH.
4. Los efectos observados se integran en dos vías a nivel hepático. La vía de β -oxidación de ácidos grasos y la de lipogénesis. La inclusión de hidroxitirosol y

aceite de chía afectó fundamentalmente la vía de β -oxidación a través de la activación de la AMPK; mientras que la de silicio disminuyó la vía de lipogénesis, inhibiendo la expresión de SREBP-1c, PPAR γ , ACC y FASN.

5. El consumo de los cárnicos funcionales bloqueó parcialmente los efectos negativos de la inducción hipercolesterolemia sobre la expresión del receptor de LDL, siendo solo significativo en el caso del grupo de silicio, aspecto que se relaciona con el mayor efecto reductor de la colesterolemia de este ingrediente.
6. Se proponen diferentes mecanismos para los tres ingredientes que modularían la expresión del receptor LDL y que están relacionados en el caso del silicio con el factor SREBP-1c y en el de hidroxitirosol y chía con la disponibilidad de ácidos grasos a nivel hepático asegurando así la esterificación del colesterol.

8.1 Conclusión general y futuras aplicaciones

La inclusión de aceite de chía, hidroxitirosol o silicio a derivados cárnicos los transforma en alimentos funcionales, ya que al ser consumidos en el marco de una dieta aterogénica muestra viabilidad y beneficios importantes para la salud cardiovascular y progresión de enfermedades relacionadas con la resistencia a la insulina, muy prevalentes en la sociedad actual. No obstante consideramos que esta Tesis es solo el inicio de otras investigaciones posteriores donde se debe incidir sobre otros aspectos, que completen la visión plural de las enfermedades degenerativas en modelos animales envejecidos o en pacientes mayores, buscando tanto la prevención como el tratamiento para permitir un diseño optimizado de dietas con base individual.

IX. SUMMARY AND CONCLUSIONS

IX. SUMMARY AND CONCLUSIONS

Effects of modified meat matrices consumption on lipid metabolism and hepatic oxidation biomarkers

In this Thesis, the stability of double emulsions, using chia oil as lipid phase and incorporating hydroxytyrosol into the internal aqueous phase, has been studied. These emulsions have also been added into a meat batter in order to evaluate its ability to improve the antioxidant profile and to know if they were a viable option to extend the shelf life of a meat product with an improved fat profile, but potentially prone to oxidation.

Finally, the viability of the use of potentially functional meat derivatives containing three different types of ingredients, such as chia oil, hydroxytyrosol and silicon was studied to know the effects on different aspects of lipoprotein metabolism, oxidative stress, insulin resistance, and hepatic lipogenic/lipolytic balance in aged rats.

In vitro and *in vivo* studies were performed. The *in vitro* studies evaluated the physical characteristics, stability, antioxidant capacity and lipid peroxidation status of the double emulsions and meat batters. The *in vivo* studies, performed with 60-week-old male Wistar rats, that were kept in accordance with the ethical criteria for the protection of animals from scientific research. The control diet (C), prepared from the modified semi-synthetic diet, without added cholesterol, to which pork is added without functional ingredients; the hypercholesterolemic control diet (HC), elaborated as diet C but in this case part of the corn starch was replaced by 1.26% cholesterol and 0.25% cholic acid; the hypercholesterolemic diets with HxT-, chia oil-, or silicon- enriched pork (HxT, CHIA, Si), similar to HC but incorporating into the meat some of these three ingredients. The antioxidant status, lipid metabolism and insulin resistance biomarkers, and lipoprotein profile were evaluated.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

The results obtained in these experiments lead us to the following **conclusions**:

A. On double emulsions and meat batters:

1. Multiple emulsions provide new ways of incorporating functional ingredients into foods.
2. $W_1/O/W_2$ emulsions prepared with chia oil showed good stability and a homogeneous structure, while those containing HxT showed good antioxidant capacity in the first days of storage.
3. The presence of chia oil promotes lipid peroxidation in cooked meat batters. However, this oil is more prone to oxidation when incorporating into the emulsion than when added in liquid form.
4. The hydroxytyrosol demonstrated good antioxidant capacity, being less effective when it was included into the internal aqueous phase of the double emulsion.

B. On *in vivo* systems

1. The incorporation of hydroxytyrosol, chia oil or silicon in meat matrices is an effective technological and nutritional strategy to ensure the dietary contribution of ingredients, with potentially beneficial effects on health, transforming the meat derivatives into functional foods.
2. Intake of meat products in the frame of high cholesterol/high saturated fat diet produces the typical effects of NASH: increased levels of cholesterol, liver size and weight, steatosis, inflammation, oxidative stress, and insulin resistance.
3. The incorporation of chia oil, hydroxytyrosol or silicon into meat partially arrests the negative effects of dietary cholesterol, reducing the pro-oxidant, hyperlipidemic, and insulin resistance enhancing effects, as well as the progression from NAFLD to NASH.
4. The observed effects are integrated into two hepatic pathways. The fatty acids β -oxidation and lipogenesis. The inclusion of hydroxytyrosol and chia oil mainly

affected the β -oxidation pathway through the activation of AMPK; while that of silicon decreased the lipogenesis pathway, inhibiting the expression of SREBP-1c, PPAR γ , ACC and FASN.

5. The consumption of functional meat partially blocked the negative effects of hypercholesterolemia induction on the expression of the LDL receptor, being only significant in the case of the silicon group, an aspect that is related to the greater reduction effect of cholesterolemia of this ingredient.
6. Different mechanisms are proposed for the three ingredients that would modulate LDL receptor expression and which are related in the case of silicon with the factor SREBP-1c, and in that of hydroxytyrosol and chia with the availability of fatty acids in liver to ensure cholesterol esterification.

9.1 General conclusion and future applications

The inclusion of chia oil, hydroxytyrosol or silicon into meat products transforms them into functional foods, since its consumption as part of an atherogenic diet, shows viability and important benefits for cardiovascular health and progression of diseases related to insulin resistance, very prevalent in today's society. Nevertheless, we consider that this Thesis is only the beginning of further investigations where other aspects must be addressed, which complement the plural view of degenerative diseases in aged animal models or in older patients, seeking both prevention and treatment to allow an optimized design of individual-based diets.

X. BIBLIOGRAFÍA

X. BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. World health organization: Nutrition. *Disponible en: www.who.int/topics/nutrition/es/ 2017.*
2. Silveira-Rodríguez, M.B.; Monereo-Megías, S.; Molina-Baena, B. Alimentos funcionales y nutrición óptima: ¿cerca o lejos? *Rev Esp Salud Pública* **2003**, *77*, 317-331.
3. Ohama, H.; Ikeda, H.; Moriyama, H. Health foods and foods with health claims in japan. *Toxicology* **2006**, *221*, 95-111.
4. Verschuren, P.M. Functional foods: Scientific and global perspectives. *Br J Nutr* **2002**, *88*, S126-S130.
5. Arai, S.; Osawa, T.; Ohigashi, H.; Yoshikawa, M.; Kaminogawa, S.; Watanabe, M.; Ogawa, T.; Okubo, K.; Watanabe, S.; Nishino, H. A mainstay of functional food science in japan. History, present status, and future outlook. *Biosci Biotechnol Biochem* **2001**, *65*, 1-13.
6. Shimizu, T. Health claims on functional foods: The japanese regulations and an international comparison. *Nutr Res Rev* **2003**, *16*, 241-252.
7. Olmedilla-Alonso, B.; Jiménez-Colmenero, F. Alimentos cárnicos funcionales: Desarrollo y evaluación de sus propiedades saludables. *Nutr Hosp* **2014**, *29*, 1197-1209.
8. Roberfroid, M.B. Global view on functional foods: European perspectives. *Br J Nutr* **2002**, *88*, S133-S138.
9. Diplock, A.; Aggett, P.; Ashwell, M.; Bornet, F.; Fern, E.; Roberfroid, M. The european commission concerted action on functional foods science in europe (fufose). Scientific concepts of functional foods in europe. Consensus document. *Br J Nutr* **1999**, *81*, S1-S27.
10. Martí del Moral, A.A.; Martínez-Hernández, J.A. *¿sabemos realmente qué comemos?: Alimentos transgénicos, ecológicos y funcionales*. Ediciones Universidad de Navarra. EUNSA: 2005.
11. González-Torres, L. Efectos sobre el metabolismo lipoproteico y estrés oxidativo en ratas zucker fa/fa de cárnicos enriquecidos con glucomanano y espirulina. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2016.
12. Behar-Demael, C.; Caradec, P.; Flamion, B.; Relano, P.; Roberfroid, M.; Yang, Y. Danone world newsletter. **2002**, *18*, 23-27.
13. Jones, P.J.; Jew, S. Functional food development: Concept to reality. *Trends Food Sci Technol* **2007**, *18*, 387-390.

14. Siro, I.; Kapolna, E.; Kápolna, B.; Lugasi, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—a review. *Appetite* **2008**, *51*, 456-467.
15. Betoret, E.; Betoret, N.; Vidal, D.; Fito, P. Functional foods development: Trends and technologies. *Trends Food Sci Technol* **2011**, *22*, 498-508.
16. Granato, D.; Branco, G.F.; Cruz, A.G.; Faria, J.A.F.; Shah, N.P. Probiotic dairy products as functional foods. *Comprehensive Reviews Food Sci Food Safety* **2010**, *9*, 455-470.
17. Borderías, A.J.; Sánchez-Alonso, I.; Pérez-Mateos, M. New applications of fibres in foods: Addition to fishery products. *Trends Food Sci Technol* **2005**, *16*, 458-465.
18. Celada, P.; Bastida, S.; Sánchez-Muniz, F.J. To eat or not to eat meat. That is the question. *Nutr Hosp* **2016**, *33*, 29.
19. Olmedilla-Alonso, B.; Jiménez-Colmenero, F.; Sánchez-Muniz, F.J. Development and assessment of healthy properties of meat and meat products designed as functional foods. *Meat Sci* **2013**, *95*, 919-930.
20. Celada, P.; Sánchez-Muniz, F.J. Are meat and meat product consumptions harmful? Their relationship with the risk of colorectal cancer and other degenerative diseases. *An Real Acad Farm* **2016**, *82*, 68-90.
21. Jiménez-Colmenero, F. *Meat based functional foods. In handbook of food products manufacturing*. John Wiley & Sons: 2007.
22. Jiménez-Colmenero, F.; Carballo, J.; Cofrades, S. Healthier meat and meat products: Their role as functional foods. *Meat Sci* **2001**, *59*, 5-13.
23. Dorado, M.; Gómez-Martín, E.M.; Jiménez-Colmenero, F.; Masoud, T.A. Cholesterol and fat contents of spanish commercial pork cuts. *Meat Sci* **1999**, *51*, 321-323.
24. Chizzolini, R.; Zanardi, E.; Dorigoni, V.; Ghidini, S. Calorific value and cholesterol content of normal and low-fat meat and meat products. *Trends Food Sci Technol* **1999**, *10*, 119-128.
25. Ferguson, L.R. Meat and cancer. *Meat Sci* **2010**, *84*, 308-313.
26. BOE. Código alimentario español. *Boletín Oficial del Estado* **1968**.
27. Jiménez-Colmenero, F.; Sánchez-Muniz, F.J.; Olmedilla-Alonso, B. Design and development of meat-based functional foods with walnut: Technological, nutritional and health impact. *Food Chem* **2010**, *123*, 959-967.
28. Cofrades, S.; Antoniou, I.; Solas, M.T.; Herrero, A.M.; Jiménez-Colmenero, F. Preparation and impact of multiple (water-in-oil-in-water) emulsions in meat systems. *Food Chem* **2013**, *141*, 338-346.

29. Jiménez-Colmenero, F. Emulsiones múltiples: Compuestos bioactivos y alimentos funcionales. *Nutr Hosp* **2013**, *28*, 1413-1421.
30. Edwards, S.S. Salvia hispanica, spanish sage. *Botanical Register* **1819**, *5*, 359.
31. Ortiz-de-Montellano, B.R. Aztec cannibalism: An ecological necessity? *Science* **1978**, *200*, 611-617.
32. Cahill, J.P. Ethnobotany of chia, salvia hispanica L.(lamiaceae). *Economic Botany* **2003**, *57*, 604-618.
33. Muñoz, L.A.; Cobos, A.; Diaz, O.; Aguilera, J.M. Chia seed (salvia hispanica): An ancient grain and a new functional food. *Food Rev Int* **2013**, *29*, 394-408.
34. US-Department-of-Health-and-Human-Services. Dietary guidelines for americans. US Government Printing Office, Washington, DC: 2015.
35. Mohd-Ali, N.; Yeap, S.K.; Ho, W.Y.; Beh, B.K.; Tan, S.W.; Tan, S.G. The promising future of chia, salvia hispanica L. *BioMed Res Int* **2012**, *2012*.
36. Chicco, A.G.; D'Alessandro, M.E.; Hein, G.J.; Oliva, M.E.; Lombardo, Y.B. Dietary chia seed (salvia hispanica L.) rich in α -linolenic acid improves adiposity and normalises hypertriacylglycerolaemia and insulin resistance in dyslipaemic rats. *Br J Nutr* **2009**, *101*, 41-50.
37. Souza, A.; Gohara, A.K.; Rotta, E.M.; Chaves, M.A.; Silva, C.M.; Dias, L.F.; Gomes, S.; Souza, N.E.; Matsushita, M. Effect of the addition of chia's by-product on the composition of fatty acids in hamburgers through chemometric methods. *J Sci Food Agr* **2015**, *95*, 928-935.
38. Laparra, J.M.; Haros, M. Inclusion of ancient latin-american crops in bread formulation improves intestinal iron absorption and modulates inflammatory markers. *Food Funct* **2016**, *7*, 1096-1102.
39. Valenzuela, R.; Barrera, C.; González-Astorga, M.; Sanhueza, J.; Valenzuela, A. Alpha linolenic acid (ala) from rosa canina, sacha inchi and chia oils may increase ala accretion and its conversion into n-3 lcpufa in diverse tissues of the rat. *Food Funct* **2014**, *5*, 1564-1572.
40. Creus, A.; Ferreira, M.R.; Oliva, M.E.; Lombardo, Y.B. Mechanisms involved in the improvement of lipotoxicity and impaired lipid metabolism by dietary alpha-linolenic acid rich salvia hispanica L (salba) seed in the heart of dyslipemic insulin-resistant rats. *J Clin Med* **2016**, *5*.

41. Bushway, A.A.; Belyea, P.R.; Bushway, R.J. Chia seed as a source of oil, polysaccharide, and protein. *J Food Sci* **1981**, *46*, 1349-1350.
42. Taga, M.S.; Miller, E.E.; Pratt, D.E. Chia seeds as a source of natural lipid antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* **1984**, *61*, 928-931.
43. Ayerza, R. Oil content and fatty acid composition of chia (*salvia hispanica* L.) from five northwestern locations in argentina. *J Am Oil Chem Soc* **1995**, *72*, 1079-1081.
44. Coates, W. Production potential of chia in northwestern argentina. *Ind Crops Prod* **1996**, *5*, 229-233.
45. Coates, W. Commercial production of chia in northwestern argentina. *J Am Oil Chem Soc* **1998**, *75*, 1417-1420.
46. US-Department-of-Agriculture. Seeds, chia seeds, dried. Nutrient database for standard reference. **2004**, 27.
47. Valdivia-López, M.A.; Tecante, A. Chia (*salvia hispanica*): A review of native mexican seed and its nutritional and functional properties. *Advances Food Nutr Res* **2015**, *75*, 53-75.
48. Sánchez-Muniz, F.J.; Bastida, S. "Lípidos". Capítulo ii.2 en: Módulo ii. "Ingestas de energía, nutrientes, y otros componentes de la dieta. Estatus". En: "Libro blanco de la nutrición en españa". Agencia española de seguridad alimentaria y nutrición (aesan) y fundación española de la nutrición (fen). **2013**, 113-124.
49. Lukiw, W.J.; Bazan, N.G. Docosahexaenoic acid and the aging brain. *J Nutr* **2008**, *138*, 2510-2514.
50. Abdul-Hamid, A.; Luan, Y.S. Functional properties of dietary fibre prepared from defatted rice bran. *Food Chem* **2000**, *68*, 15-19.
51. Chau, C.F.; Chen, C.H.; Lee, M.H. Comparison of the characteristics, functional properties, and in vitro hypoglycemic effects of various carrot insoluble fiber-rich fractions. *LWT-Food Sci Technol* **2004**, *37*, 155-160.
52. Esposito, F.; Arlotti, G.; Bonifati, A.M.; Napolitano, A.; Vitale, D.; Fogliano, V. Antioxidant activity and dietary fibre in durum wheat bran by-products. *Food Res Int* **2005**, *38*, 1167-1173.
53. Guillon, F.; Champ, M. Structural and physical properties of dietary fibres, and consequences of processing on human physiology. *Food Res Int* **2000**, *33*, 233-245.

54. Coates, W.; Ayerza, R. Chia (l.) seed as an n-3 fatty acid source for finishing pigs: Effects on fatty acid composition and fat stability of the meat and internal fat, growth performance, and meat sensory characteristics. *J Anim Sci* **2009**, *87*, 3798-3804.
55. Peiretti, P.G.; Gai, F. Fatty acid and nutritive quality of chia (salvia hispanica l.) seeds and plant during growth. *Animal Feed Sci Technol* **2009**, *148*, 267-275.
56. Martínez, M.L.; Curti, M.I.; Rocchia, P.; Llabot, J.M.; Penci, M.C.; Bodoira, R.M.; Ribotta, P.D. Oxidative stability of walnut (juglans regia l.) and chia (salvia hispanica l.) oils microencapsulated by spray drying. *Powder Technol* **2015**, *270*, 271-277.
57. Ayerza, R.; Coates, W. Effect of dietary α -linolenic fatty acid derived from chia when fed as ground seed, whole seed and oil on lipid content and fatty acid composition of rat plasma. *Ann Nutr Metab* **2007**, *51*, 27-34.
58. Azcona, J.O.; Schang, M.J.; Garcia, P.T.; Gallinger, C.; Ayerza-Jr, R.; Coates, W. Omega-3 enriched broiler meat: The influence of dietary α -linolenic- ω -3 fatty acid sources on growth, performance and meat fatty acid composition. *Can J Anim Sci* **2008**, *88*, 257-269.
59. Ayerza, R.; Coates, W. Dietary levels of chia: Influence on yolk cholesterol, lipid content and fatty acid composition for two strains of hens. *Poul Sci* **2000**, *79*, 724-739.
60. Rodea-González, D.A.; Cruz-Olivares, J.; Román-Guerrero, A.; Rodríguez-Huezo, M.E.; Vernon-Carter, E.J.; Pérez-Alonso, C. Spray-dried encapsulation of chia essential oil (salvia hispanica l.) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. *J Food Engineering* **2012**, *111*, 102-109.
61. Vázquez-Ovando, A.; Betancur-Ancona, D.; Chel-Guerrero, L. Physicochemical and functional properties of a protein-rich fraction produced by dry fractionation of chia seeds (salvia hispanica l.). *CyTA-Journal of Food* **2013**, *11*, 75-80.
62. Vazquez-Ovando, J.A.; Rosado-Rubio, J.G.; Chel-Guerrero, L.A.; Betancur-Ancona, D.A. Procesamiento en seco de harina de chía (salvia hispanica l.): Caracterización química de fibra y proteína dry processing of chía (salvia hispanica l.) flour: Chemical characterization of fiber and protein. *CyTA-Journal of Food* **2010**, *8*, 117-127.
63. Muñoz, L.A.; Cobos, A.; Diaz, O.; Aguilera, J.M. Chia seeds: Microstructure, mucilage extraction and hydration. *J Food Engineering* **2012**, *108*, 216-224.
64. Olivos-Lugo, B.L.; Valdivia-López, M.A.; Tecante, A. Thermal and physicochemical properties and nutritional value of the protein fraction of mexican chia seed (salvia hispanica l.). *Food Sci Technol Int* **2010**.

65. Martínez-Cruz, O.; Paredes-López, O. Phytochemical profile and nutraceutical potential of chia seeds (*salvia hispanica* L.) by ultra high performance liquid chromatography. *J Chromatography A* **2014**, *1346*, 43-48.
66. Reyes-Caudillo, E.; Tecante, A.; Valdivia-López, M.A. Dietary fibre content and antioxidant activity of phenolic compounds present in mexican chia (*salvia hispanica* L.) seeds. *Food Chem* **2008**, *107*, 656-663.
67. Chao, C.-L.; Hou, Y.-C.; Chao, P.-D.L.; Weng, C.-S.; Ho, F.-M. The antioxidant effects of quercetin metabolites on the prevention of high glucose-induced apoptosis of human umbilical vein endothelial cells. *Brit J Nutr* **2009**, *101*, 1165-1170.
68. Ulbricht, C.; Chao, W.; Nummy, K.; Rusie, E.; Tanguay-Colucci, S.; Iannuzzi, C.M.; Plammoottil, J.B.; Varghese, M.; Weissner, W. Chia (*salvia hispanica*): A systematic review by the natural standard research collaboration. *Reviews Recent Clin Trials* **2009**, *4*, 168-174.
69. Vuksan, V.; Whitham, D.; Sievenpiper, J.L.; Jenkins, A.L.; Rogovik, A.L.; Bazinet, R.P.; Vidgen, E.; Hanna, A. Supplementation of conventional therapy with the novel grain salba (*salvia hispanica* L.) improves major and emerging cardiovascular risk factors in type 2 diabetes: Results of a randomized controlled trial. *Diabetes Care* **2007**, *30*, 2804-2810.
70. Vuksan, V.; Jenkins, A.L.; Dias, A.G.; Lee, A.S.; Jovanovski, E.; Rogovik, A.L.; Hanna, A. Reduction in postprandial glucose excursion and prolongation of satiety: Possible explanation of the long-term effects of whole grain salba (*salvia hispanica* L.). *Eur J Clin Nutr* **2010**, *64*, 436-438.
71. Coates, W. Whole and ground chia (*salvia hispanica* L.) seeds, chia oil—effects on plasma lipids and fatty acids. *Nuts Seeds Health Dis Prev* **2011**, 309-315.
72. Sánchez-Muniz, F.J.; Olivero-David, R.; Triki, M.; Salcedo, L.; González-Muñoz, M.J.; Cofrades, S.; Ruiz-Capillas, C.; Jiménez-Colmenero, F.; Benedi, J. Antioxidant activity of hypericum perforatum L. Extract in enriched n-3 pufa pork meat systems during chilled storage. *Food Res Int* **2012**, *48*, 909-915.
73. Bastida, S.; Sánchez-Muniz, F.J.; Olivero, R.; Pérez-Olleros, L.; Ruiz-Roso, B.; Jiménez-Colmenero, F. Antioxidant activity of carob fruit extracts in cooked pork meat systems during chilled and frozen storage. *Food Chem* **2009**, *116*, 748-754.

74. Cofrades, S.; Sandoval-Salcedo, L.; Delgado-Pando, G.; López-López, I.; Ruiz-Capillas, C.; Jiménez-Colmenero, F. Antioxidant activity of hydroxytyrosol in frankfurters enriched with n-3 polyunsaturated fatty acids. *Food Chem* **2011**, *129*, 429-436.
75. Fang, Y.Z.; Yang, S.; Wu, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition* **2002**, *18*, 872-879.
76. Panzella, L.; Verotta, L.; Goya, L.; Ramos, S.; Martín, M.A.; Bravo, L.; Napolitano, A.; d'Ischia, M. Synthesis and bioactivity profile of 5-s-lipoylhydroxytyrosol-based multidefense antioxidants with a sizeable (poly) sulfide chain. *J Agr Food Chem* **2013**, *61*, 1710-1717.
77. Vázquez-Velasco, M.; Díaz, L.E.; Lucas, R.; Gómez-Martínez, S.; Bastida, S.; Marcos, A.; Sánchez-Muniz, F.J. Effects of hydroxytyrosol-enriched sunflower oil consumption on cvd risk factors. *Brit J Nutr* **2011**, *105*, 1448-1452.
78. Vissers, M.N.; Zock, P.L.; Roodenburg, A.J.; Leenen, R.; Katan, M.B. Olive oil phenols are absorbed in humans. *J Nutr* **2002**, *132*, 409-417.
79. Brenes, M.; García, A.; García, P.; Rios, J.J.; Garrido, A. Phenolic compounds in spanish olive oils. *J Agr Food Chem* **1999**, *47*, 3535-3540.
80. Tripoli, E.; Giammanco, M.; Tabacchi, G.; Di Majo, D.; Giammanco, S.; La Guardia, M. The phenolic compounds of olive oil: Structure, biological activity and beneficial effects on human health. *Nutr Res Rev* **2005**, *18*, 98-112.
81. Boskou, D.; Visioli, F. Biophenols in olive oil and olives. *Bioavailability of micronutrients and minor dietary compounds. Metabolic and technological aspects* **2003**, 161-169.
82. D'Angelo, S.; Manna, C.; Migliardi, V.; Mazzoni, O.; Morrica, P.; Capasso, G.; Pontoni, G.; Galletti, P.; Zappia, V. Pharmacokinetics and metabolism of hydroxytyrosol, a natural antioxidant from olive oil. *Drug Met Disp* **2001**, *29*, 1492-1498.
83. Tuck, K.L.; Freeman, M.P.; Hayball, P.J.; Stretch, G.L.; Stupans, I. The in vivo fate of hydroxytyrosol and tyrosol, antioxidant phenolic constituents of olive oil, after intravenous and oral dosing of labeled compounds to rats. *J Nutr* **2001**, *131*, 1993-1996.
84. Visioli, F.; Galli, C.; Grande, S.; Colonnelli, K.; Patelli, C.; Galli, G.; Caruso, D. Hydroxytyrosol excretion differs between rats and humans and depends on the vehicle of administration. *J Nutr* **2003**, *133*, 2612-2615.
85. Miro-Casas, E.; Covas, M.I.; Farre, M.; Fito, M.; Ortuño, J.; Weinbrenner, T.; Roset, P.; De-la-Torre, R. Hydroxytyrosol disposition in humans. *Clin Chem* **2003**, *49*, 945-952.

86. Miro-Casas, E.; Covas, M.I.; Fito, M.; Farre-Albadalejo, M.; Marrugat, J.; De-La-Torre, R. Tyrosol and hydroxytyrosol are absorbed from moderate and sustained doses of virgin olive oil in humans. *Eur J Clin Nutr* **2003**, *57*, 186-190.
87. Caruso, D.; Visioli, F.; Patelli, R.; Galli, C.; Galli, G. Urinary excretion of olive oil phenols and their metabolites in humans. *Metabolism* **2001**, *50*, 1426-1428.
88. Miró-Casas, E.; Albaladejo, M.; Covas, M.I.; Rodriguez, J.O.; Colomer, E.M.; Raventós, R.M.L.; De-La-Torre, R. Capillary gas chromatography–mass spectrometry quantitative determination of hydroxytyrosol and tyrosol in human urine after olive oil intake. *Anal Biochem* **2001**, *294*, 63-72.
89. Visioli, F.; Galli, C.; Bornet, F.; Mattei, A.; Patelli, R.; Galli, G.; Caruso, D. Olive oil phenolics are dose-dependently absorbed in humans. *FEBS letters* **2000**, *468*, 159-160.
90. Tuck, K.L.; Hayball, P.J. Major phenolic compounds in olive oil: Metabolism and health effects. *J Nutr Biochem* **2002**, *13*, 636-644.
91. Pérez-Jiménez, J.; Hubert, J.; Hooper, L.; Cassidy, A.; Manach, C.; Williamson, G.; Scalbert, A. Urinary metabolites as biomarkers of polyphenol intake in humans: A systematic review. *Am J Clin Nutr* **2010**, ajcn. 29924.
92. Soni, M.G.; Burdock, G.A.; Christian, M.S.; Bitler, C.M.; Crea, R. Safety assessment of aqueous olive pulp extract as an antioxidant or antimicrobial agent in foods. *Food Chem Toxicol* **2006**, *44*, 903-915.
93. Christian, M.S.; Sharper, V.A.; Hoberman, A.M.; Seng, J.E.; Fu, L.J.; Covell, D.; Diener, R.M.; Bitler, C.M.; Crea, R. The toxicity profile of hydrolyzed aqueous olive pulp extract. *Drug Chem Toxicol* **2004**, *27*, 309-330.
94. De-Pinedo, A.; Peñalver, P.; Morales, J.C. Synthesis and evaluation of new phenolic-based antioxidants: Structure–activity relationship. *Food Chem* **2007**, *103*, 55-61.
95. Mateos, R.; Domínguez, M.M.; Espartero, J.L.; Cert, A. Antioxidant effect of phenolic compounds, α -tocopherol, and other minor components in virgin olive oil. *J Agr Food Chem* **2003**, *51*, 7170-7175.
96. Cornwell, D.G.; Ma, J. Nutritional benefit of olive oil: The biological effects of hydroxytyrosol and its arylating quinone adducts. *J Agr Food Chem* **2008**, *56*, 8774-8786.
97. Goya, L.; Mateos, R.; Bravo, L. Effect of the olive oil phenol hydroxytyrosol on human hepatoma hepg2 cells. *Eur J Nutr* **2007**, *46*, 70-78.

98. Jemai, H.; Bouaziz, M.; Fki, I.; El-Feki, A.; Sayadi, S. Hypolipidimic and antioxidant activities of oleuropein and its hydrolysis derivative-rich extracts from chemlali olive leaves. *Chemico-Biological interactions* **2008**, *176*, 88-98.
99. Oliveras-López, M.J.; Berná, G.; Carneiro, E.M.; De-la-Serrana López-García, H.; Martín, F.; López, M.C. An extra-virgin olive oil rich in polyphenolic compounds has antioxidant effects in of1 mice. *J Nutr* **2008**, *138*, 1074-1078.
100. Martín, M.A.; Ramos, S.; Granado-Serrano, A.B.; Rodríguez-Ramiro, I.; Trujillo, M.; Bravo, L.; Goya, L. Hydroxytyrosol induces antioxidant/detoxificant enzymes and nrf2 translocation via extracellular regulated kinases and phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase b pathways in hepg2 cells. *Mol Nutr Food Res* **2010**, *54*, 956-966.
101. Mateos, R.; Bravo, L. Chromatographic and electrophoretic methods for the analysis of biomarkers of oxidative damage to macromolecules (DNA, lipids, and proteins). *J Sep Sci* **2007**, *30*, 175-191.
102. Covas, M.I.; Nyyssönen, K.; Poulsen, H.E.; Kaikkonen, J.; Zunft, H.J.F.; Kieseewetter, H.; Gaddi, A.; Dela-Torre, R.; Mursu, J.; Bäumlér, H. The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factorsa randomized trial. *Annals Internal Med* **2006**, *145*, 333-341.
103. Marrugat, J.; Covas, M.I.; Fitó, M.; Schröder, H.; Miró-Casas, E.; Gimeno, E.; López-Sabater, M.C.; De-la-Torre, R.; Farré, M. Effects of differing phenolic content in dietary olive oils on lipids and ldl oxidation. *Eur J Nutr* **2004**, *43*, 140-147.
104. Visioli, F.; Wolfram, R.; Richard, D.; Abdullah, M.I.C.B.; Crea, R. Olive phenolics increase glutathione levels in healthy volunteers. *J Agr Food Chem* **2009**, *57*, 1793-1796.
105. Pacheco, Y.M.; Bermúdez, B.; López, S.; Abia, R.; Villar, J.; Muriana, F.J.G. Minor compounds of olive oil have postprandial anti-inflammatory effects. *Br J Nutr* **2007**, *98*, 260-263.
106. Fitó, M.; Cladellas, M.; De-la-Torre, R.; Martí, J.; Munoz, D.; Schröder, H.; Alcántara, M.; Pujadas-Bastardes, M.; Marrugat, J.; López-Sabater, M.C. Anti-inflammatory effect of virgin olive oil in stable coronary disease patients: A randomized, crossover, controlled trial. *Eur J Clin Nutr* **2008**, *62*, 570-574.
107. Dell'Agli, M.; Maschi, O.; Galli, G.V.; Fagnani, R.; Dal-Cero, E.; Caruso, D.; Bosisio, E. Inhibition of platelet aggregation by olive oil phenols via camp-phosphodiesterase. *Br J Nutr* **2008**, *99*, 945-951.

108. Carluccio, M.A.; Siculella, L.; Ancora, M.A.; Massaro, M.; Scoditti, E.; Storelli, C.; Visioli, F.; Distante, A.; De Caterina, R. Olive oil and red wine antioxidant polyphenols inhibit endothelial activation. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2003**, *23*, 622-629.
109. Sánchez-Muniz, F.J.; Oubiña, P.; Benedi, J.; Ródenas, S.; Cuesta, C. A preliminary study on platelet aggregation in postmenopausal women consuming extra-virgin olive oil and high-oleic acid sunflower oil. *J Am Oil Chem Soc* **1998**, *75*, 217-223.
110. Oubiña, P.; Sánchez-Muniz, F.J.; Ródenas, S.; Cuesta, C. Eicosanoid production, thrombogenic ratio, and serum and ldl peroxides in normo- and hypercholesterolaemic post-menopausal women consuming two oleic acid-rich diets with different content of minor components. *Br J Nutr* **2001**, *85*, 41-47.
111. Gonzalez-Santiago, M.; Martín-Bautista, E.; Carrero, J.J.; Fonolla, J.; Baro, L.; Bartolome, M.V.; Gil-Loyzaga, P.; Lopez-Huertas, E. One-month administration of hydroxytyrosol, a phenolic antioxidant present in olive oil, to hyperlipemic rabbits improves blood lipid profile, antioxidant status and reduces atherosclerosis development. *Atherosclerosis* **2006**, *188*, 35-42.
112. Bogani, P.; Galli, C.; Villa, M.; Visioli, F. Postprandial anti-inflammatory and antioxidant effects of extra virgin olive oil. *Atherosclerosis* **2007**, *190*, 181-186.
113. Gong, D.; Geng, C.; Jiang, L.; Cao, J.; Yoshimura, H.; Zhong, L. Effects of hydroxytyrosol-20 on carrageenan-induced acute inflammation and hyperalgesia in rats. *Phytotherapy Res* **2009**, *23*, 646-650.
114. Pauwels, E.K.J. The mediterranean diet, part iii: Compounds, components and considerations in relation to the risk of type 2 diabetes. *Drugs Future* **2009**, *34*, 903.
115. Gesteiro, E.; Bernal, B.R.; Bastida, S.; Sánchez-Muniz, F.J. Maternal diets with low healthy eating index or mediterranean diet adherence scores are associated with high cord-blood insulin levels and insulin resistance markers at birth. *Eur J Clin Nutr* **2012**, *66*, 1008-1015.
116. Gesteiro, E.; Sánchez-Muniz, F.J.; Ortega-Azorín, C.; Guillén, M.; Corella, D.; Bastida, S. Maternal and neonatal fto. *J Physiol Biochem* **2016**, *72*, 169-181.
117. Hamden, K.; Allouche, N.; Damak, M.; Elfeki, A. Hypoglycemic and antioxidant effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol from olive mill waste in vitro and in rats. *Chemico-Biological Interactions* **2009**, *180*, 421-432.

118. Jemai, H.; El-Feki, A.; Sayadi, S. Antidiabetic and antioxidant effects of hydroxytyrosol and oleuropein from olive leaves in alloxan-diabetic rats. *J Agr Food Chem* **2009**, *57*, 8798-8804.
119. Poudyal, H.; Campbell, F.; Brown, L. Olive leaf extract attenuates cardiac, hepatic, and metabolic changes in high carbohydrate-, high fat-fed rats. *J Nutr* **2010**, *140*, 946-953.
120. Hamden, K.; Allouche, N.; Jouadi, B.; El-Fazaa, S.; Gharbi, N.; Carreau, S.; Damak, M.; Elfeki, A. Inhibitory action of purified hydroxytyrosol from stored olive mill waste on intestinal disaccharidases and lipase activities and pancreatic toxicity in diabetic rats. *Food Sci Biotechnol* **2010**, *19*, 439-447.
121. Greenwood, N.N.; Earnshaw, A. *Chemistry of the elements*. Elsevier: 2012.
122. Sahebi, M.; Hanafi, M.M.; Siti-Nor-Akmar, A.; Rafii, M.Y.; Azizi, P.; Tengoua, F.F.; Nurul-Mayzaitul-Azwa, J.; Shabanimofrad, M. Importance of silicon and mechanisms of biosilica formation in plants. *Biomed Res Int* **2015**, *2015*.
123. Martin, K.R. The chemistry of silica and its potential health benefits. *J Nutr Health Aging* **2007**, *11*, 94.
124. Martin, K.R. Silicon: The health benefits of a metalloid. In *Interrelations between essential metal ions and human diseases*, Springer: 2013; pp 451-473.
125. Willhite, C.C.; Ball, G.L.; McLellan, C.J. Total allowable concentrations of monomeric inorganic aluminum and hydrated aluminum silicates in drinking water. *Critical Rev Toxicol* **2012**, *42*, 358-442.
126. Perry, C.C.; Keeling-Tucker, T. Biosilicification: The role of the organic matrix in structure control. *J Biol In Chem* **2000**, *5*, 537-550.
127. Jurkić, L.M.; Cepanec, I.; Pavelić, S.K.; Pavelić, K. Biological and therapeutic effects of ortho-silicic acid and some ortho-silicic acid-releasing compounds: New perspectives for therapy. *Nutr Metab* **2013**, *10*, 2.
128. Powell, J.J.; McNaughton, S.A.; Jugdaohsingh, R.; Anderson, S.H.C.; Dear, J.; Khot, F.; Mowatt, L.; Gleason, K.L.; Sykes, M.; Thompson, R.P.H. A provisional database for the silicon content of foods in the united kingdom. *Br J Nutr* **2005**, *94*, 804-812.
129. Robberecht, H.; Van-Cauwenbergh, R.; Van Vlaslaer, V.; Hermans, N. Dietary silicon intake in belgium: Sources, availability from foods, and human serum levels. *Science of the total environment* **2009**, *407*, 4777-4782.

130. Pennington, J.A.T. Silicon in foods and diets. *Food Additives & Contaminants* **1991**, 8, 97-118.
131. Bellia, J.P.; Birchall, J.D.; Roberts, N.B. Beer: A dietary source of silicon. *Lancet* **1994**, 343, 235.
132. Sripanyakorn, S.; Jugdaohsingh, R.; Elliott, H.; Walker, C.; Mehta, P.; Shoukru, S.; Thompson, R.P.H.; Powell, J.J. The silicon content of beer and its bioavailability in healthy volunteers. *Br J Nutr* **2004**, 91, 403-409.
133. Barnett, P.R.; Skougstad, M.W.; Miller, K.J. Chemical characterization of a public water supply (pdf). *J Am Water Works Assoc* **1969**, 61, 60-67.
134. Villota, R.; Hawkes, J.G.; Cochrane, H. Food applications and the toxicological and nutritional implications of amorphous silicon dioxide. *Critical Rev Food Sci Nutr* **1986**, 23, 289-321.
135. Barel, A.; Calomme, M.; Timchenko, A.; Paepe, K.D.; Demeester, N.; Rogiers, V.; Clarys, P.; Berghe, D.V. Effect of oral intake of choline-stabilized orthosilicic acid on skin, nails and hair in women with photodamaged skin. *Archives Dermatol Res* **2005**, 297, 147-153.
136. Van-Dyck, K.; Van-Cauwenbergh, R.; Robberecht, H.; Deelstra, H. Bioavailability of silicon from food and food supplements. *Fresenius' J Anal Chem* **1999**, 363, 541-544.
137. EFSA. Scientific opinion. Safety of organic silicon (monomethylsilanetriol, mmst) as a novel food ingredient for use as a source of silicon in food supplements and bioavailability of orthosilicic acid from the source. *Panel on Food Additives and Nutrient Sources added to Food* **2004**.
138. Food-Standards-Agency. Disponible en: Cot.Food.Gov.Uk/committee/committee-on-toxicity/cotreports/cotjointreps/evmreport. *Expert group on vitamins and minerals* **2003**.
139. Takizawa, Y.; Hirasawa, F.; Noritomi, E.; Aida, M.; Tsunoda, H.; Uesugi, S. Oral ingestion of syloid to mice and rats and its chronic toxicity and carcinogenicity. *Acta Medica et Biologica* **1988**, 36, 27-56.
140. Seaborn, C.D.; Briske-Anderson, M.; Nielsen, F.H. An interaction between dietary silicon and arginine affects immune function indicated by con-a-induced DNA synthesis of rat splenic t-lymphocytes. *Biol Trace Elem Res* **2002**, 87, 133-142.
141. Schwarz, K. Silicon, fibre, and atherosclerosis. *Lancet* **1977**, 309, 454-457.
142. Schwarz, K.; Ricci, B.A.; Punsar, S.; Karvonen, M.J. Inverse relation of silicon in drinking water and atherosclerosis in finland. *Lancet* **1977**, 309, 538-539.

143. Loeper, J.; Goy-Loeper, J.; Rozensztajn, L.; Fragny, M. The antiatheromatous action of silicon. *Atherosclerosis* **1979**, *33*, 397-408.
144. Loeper, J.; Fragny, M. In *The physiological role of the silicon and its antiatheromatous action*, Biochemistry of silicon and related problems, 1978; Springer: pp 281-296.
145. Loeper, J.; Lemaire, A. Study of silicon in human atherosclerosis. *Giornale di Clinica Medica* **1966**, *47*, 595-605.
146. Peluso, M.R.; Schneeman, B.O. A food-grade silicon dioxide is hypocholesterolemic in the diet of cholesterol-fed rats. *Cellulose* **1994**, *59*, 45.
147. Wachter, H.; Lechleitner, M.; Artner-Dworzak, E.; Hausen, A.; Jarosch, E.; Widner, B.; Patsch, J.; Pfeiffer, K.; Fuchs, D. Diatomaceous earth lowers blood cholesterol concentrations. *Eur J Med Res* **1998**, *3*, 211-215.
148. Tubek, S. Role of trace elements in primary arterial hypertension. *Biological trace element research* **2006**, *114*, 1-5.
149. O'Connell, B.S. Select vitamins and minerals in the management of diabetes. *Diabetes Spectrum* **2001**, *14*, 133-148.
150. Oschilewski, U.; Kiesel, U.; Kolb, H. Administration of silica prevents diabetes in bb-rats. *Diabetes* **1985**, *34*, 197-199.
151. Maehira, F.; Motomura, K.; Ishimine, N.; Miyagi, I.; Eguchi, Y.; Teruya, S. Soluble silica and coral sand suppress high blood pressure and improve the related aortic gene expressions in spontaneously hypertensive rats. *Nutr Res* **2011**, *31*, 147-156.
152. Liang, Y. Effects of silicon on enzyme activity and sodium, potassium and calcium concentration in barley under salt stress. *Plant and Soil* **1999**, *209*, 217-224.
153. Liang, Y.; Chen, Q.I.N.; Liu, Q.; Zhang, W.; Ding, R. Exogenous silicon (si) increases antioxidant enzyme activity and reduces lipid peroxidation in roots of salt-stressed barley (*hordeum vulgare* L.). *J Plant Physiol* **2003**, *160*, 1157-1164.
154. Zhu, Z.; Wei, G.; Li, J.; Qian, Q.; Yu, J. Silicon alleviates salt stress and increases antioxidant enzymes activity in leaves of salt-stressed cucumber (*cucumis sativus* L.). *Plant Sci* **2004**, *167*, 527-533.
155. Gong, H.; Zhu, X.; Chen, K.; Wang, S.; Zhang, C. Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Plant Sci* **2005**, *169*, 313-321.

156. Tale-Ahmad, S.; Haddad, R. Study of silicon effects on antioxidant enzyme activities and osmotic adjustment of wheat under drought stress. *Czech J Gen Plant Breeding* **2011**, *47*, 17-27.
157. González-Muñoz, M.J.; Meseguer, I.; Sánchez-Reus, M.I.; Schultz, A.; Olivero-David, R.; Benedí, J.; Sánchez-Muniz, F.J. Beer consumption reduces cerebral oxidation caused by aluminum toxicity by normalizing gene expression of tumor necrotic factor alpha and several antioxidant enzymes. *Food Chem Toxicol* **2008**, *46*, 1111-1118.
158. González-Muñoz, M.J.; Garcimartán, A.; Meseguer, I.; Mateos-Vega, C.J.; Orellana, J.M.; Peña-Fernández, A.; Benedí, J.; Sánchez-Muniz, F.J. Silicic acid and beer consumption reverses the metal imbalance and the prooxidant status induced by aluminum nitrate in mouse brain. *J Alzheimer's Dis* **2017**, 1-11.
159. Kim, E.J.; Bu, S.Y.; Sung, M.K.; Kang, M.H.; Choi, M.K. Analysis of antioxidant and anti-inflammatory activity of silicon in murine macrophages. *Biol Trace Elem Res* **2013**, *156*, 329-337.
160. Alberti, K.; George, M.; Zimmet, P.; Shaw, J. Metabolic syndrome—a new world-wide definition. A consensus statement from the international diabetes federation. *Diabetic Med* **2006**, *23*, 469-480.
161. Zimmet, P.; Alberti, K.G.M.M.; Shaw, J. Global and societal implications of the diabetes epidemic. *Nature* **2001**, *414*, 782-787.
162. Sánchez-Muniz, F.J. La obesidad: Un grave problema de salud pública. *An Real Acad Farm* **2016**, 6-26.
163. Nilsson, P.M.; Engström, G.; Hedblad, B. The metabolic syndrome and incidence of cardiovascular disease in non-diabetic subjects—a population-based study comparing three different definitions. *Diabetic Med* **2007**, *24*, 464-472.
164. Ashwell, M. Ilsi europe concise monograph series concepts of functional foods. *ILSI Europe Concise monograph series* **2002**, *40 S*, 7894-7810.
165. Galera-Martínez, R.; García-García, E.; Vázquez-López, M.; Ortiz-Pérez, M.; Ruiz-Sánchez, A.M.; Martín-González, M.; Garrido-Fernández, P.; Bonillo-Perales, A. Prevalence of metabolic syndrome among adolescents in a city in the mediterranean area: Comparison of two definitions. *Nutr Hosp* **2015**.

166. Orgaz-Gallego, M.P.; Bermejo-López, P.; Tricio-Armero, M.A.; Abellán-Alemán, J.; Solera-Albero, J.; Tárraga-López, P.J. Metabolic syndrome and its components in spanish postmenopausal women. *Nutr Hosp* **32**, 656-666.
167. Hennekens, C.H.; Andreotti, F. Leading avoidable cause of premature deaths worldwide: Case for obesity. *Am J Med* **2013**, *126*, 97-98.
168. Carmienke, S.; Freitag, M.H.; Pischon, T.; Schlattmann, P.; Fankhaenel, T.; Goebel, H.; Gensichen, J. General and abdominal obesity parameters and their combination in relation to mortality: A systematic review and meta-regression analysis. *Eur J Clin Nutr* **2013**, *67*, 573-585.
169. Finelli, C.; Padula, M.C.; Martelli, G.; Tarantino, G. Could the improvement of obesity-related co-morbidities depend on modified gut hormones secretion. *World J Gastroenterol* **2014**, *20*, 16649-16664.
170. Friedman, J.M. A war on obesity, not the obese. *Science* **2003**, *299*, 856.
171. Villagrán Pérez, S.; Rodríguez-Martín, A.; Novalbos Ruiz, J.P.; Martínez Nieto, J.M.; Lechuga Campoy, J.L. Hábitos y estilos de vida modificables en niños con sobrepeso y obesidad. *Nutr Hosp* **2010**, *25*, 823-831.
172. Cascales-Angosto, M. Obesidad: Pandemia del siglo xxi. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia* **2015**.
173. Chen, S.Y.; Lin, S.J.; Lin, S.H.; Chou, Y.Y. Early adiposity rebound and obesity in children with congenital hypothyroidism. *Pediatrics Neonatol* **2013**, *54*, 107-112.
174. Yassin, D.J.; Doros, G.; Hammerer, P.G.; Yassin, A.A. Long-term testosterone treatment in elderly men with hypogonadism and erectile dysfunction reduces obesity parameters and improves metabolic syndrome and health-related quality of life. *J Sexual Med* **2014**, *11*, 1567-1576.
175. De-França, G.V.A.; Gigante, D.P.; Olinto, M.T.A. Binge eating in adults: Prevalence and association with obesity, poor self-rated health status and body dissatisfaction. *Public health nutrition* **2014**, *17*, 932-938.
176. Cascales-Angosto, M. *La toxicidad del oxígeno. Estrés oxidativo, envejecimiento y enfermedad*. Instituto de España: 1999.
177. Corella, D.; Ordovás, J.M. Genética de la obesidad. Predictores de la obesidad: El " poder" de las ómicas. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia* **2015**.

178. Flier, J.S.; Mekalanos, J.J. Gut check: Testing a role for the intestinal microbiome in human obesity. *Science translational medicine* **2009**, *1*, 6ps7-6ps7.
179. Ayerza, R.; Coates, W. An ω -3 fatty acid enriched chia diet: Influence on egg fatty acid composition, cholesterol and oil content. *Canadian J Animal Sci* **1999**, *79*, 53-58.
180. Egger, G.; Dixon, J. Beyond obesity and lifestyle: A review of 21st century chronic disease determinants. *Biomed Res Int* **2014**, *2014*.
181. Corella, D.; Coltell, O.; Ordovás, J.M. In *Genética y epigenética de la obesidad*, Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2016.
182. Wirth, A.; Wabitsch, M.; Hauner, H. Prävention und therapie der adipositas. *Deutsches Ärzteblatt* **2014**, *111*, 705-713.
183. Sánchez-Muniz, F.J.; Sanz-Pérez, B. Importancia de la dieta en la obesidad. *Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia* **2015**.
184. American-Diabetes-Association. Classification and diagnosis of diabetes. *Diabetes care* **2015**, *38*, S8-S16.
185. Maleckas, A.; Venclauskas, L.; Wallenius, V.; Lönnroth, H.; Fändriks, L. Surgery in the treatment of type 2 diabetes mellitus. *Scandinavian Journal of Surgery* **2015**, *104*, 40-47.
186. Sánchez-Muniz, F.J.; Gesteiro, E.; Espárrago-Rodilla, M.; Rodríguez-Bernal, B.; Bastida, S. La alimentación de la madre durante el embarazo condiciona el desarrollo pancreático, el estatus hormonal del feto y la concentración de biomarcadores al nacimiento de diabetes mellitus y síndrome metabólico. *Nutr Hosp* **2013**, *28*, 250-274.
187. Cosson, E. Diagnostic criteria for gestational diabetes mellitus. *Diabetes Metab* **2010**, *36*, 538-548.
188. Kerner, W.; Brückel, J. Definition, classification and diagnosis of diabetes mellitus. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* **2014**, *122*, 384-386.
189. European-Diabetes-Policy-Group. A desktop guide to type 2 diabetes mellitus. *Diabetic Medicine* **1999**, *16*, 716-730.
190. McLellan, K.; Wyne, K.; Villagomez, E.T.; Hsueh, W.A. Therapeutic interventions to reduce the risk of progression from prediabetes to type 2 diabetes mellitus. *Therapeutics and clinical risk management* **2014**, 173-188.
191. Carpentier, A.; Giacca, A.; Lewis, G.F. Effect of increased plasma non-esterified fatty acids (nefas) on arginine-stimulated insulin secretion in obese humans. *Diabetologia* **2001**, *44*, 1989-1997.

192. Saltiel, A.R.; Kahn, C.R. Insulin signalling and the regulation of glucose and lipid metabolism. *Nature* **2001**, *414*, 799-806.
193. Klover, P.J.; Mooney, R.A. Hepatocytes: Critical for glucose homeostasis. *Int J Biochem Cell Biol* **2004**, *36*, 753-758.
194. Kaul, K.; Tarr, J.M.; Ahmad, S.I.; Kohner, E.M.; Chibber, R. Introduction to diabetes mellitus. In *Diabetes*, Springer: 2013; pp 1-11.
195. Wilding, J.; Van Gaal, L.; Rissanen, A.; Vercruysse, F.; Fitchet, M. A randomized double-blind placebo-controlled study of the long-term efficacy and safety of topiramate in the treatment of obese subjects. *Int J Obesity* **2004**, *28*, 1399-1410.
196. Meshkani, R.; Adeli, K. Hepatic insulin resistance, metabolic syndrome and cardiovascular disease. *Clin Biochem* **2009**, *42*, 1331-1346.
197. Rochette, L.; Zeller, M.; Cottin, Y.; Vergely, C. Diabetes, oxidative stress and therapeutic strategies. *Biochim Biophys Acta (BBA)* **2014**, *1840*, 2709-2729.
198. Stumvoll, M.; Goldstein, B.J.; van Haefen, T.W. Type 2 diabetes: Principles of pathogenesis and therapy. *Lancet* **2005**, *365*, 1333-1346.
199. Randle, P.J.; Garland, P.B.; Hales, C.N.; Newsholme, E.A. The glucose fatty-acid cycle its role in insulin sensitivity and the metabolic disturbances of diabetes mellitus. *Lancet* **1963**, *281*, 785-789.
200. Herman, M.A.; Kahn, B.B. Glucose transport and sensing in the maintenance of glucose homeostasis and metabolic harmony. *J Clin Invest* **2006**, *116*, 1767-1775.
201. Bronfman, M.; Morales, M.N.; Orellana, A. Diacylglycerol activation of protein kinase c is modulated by long-chain acyl-coa. *Biochem Biophys Res Commun* **1988**, *152*, 987-992.
202. Belfort, R.; Mandarino, L.; Kashyap, S.; Wirfel, K.; Pratipanawatr, T.; Berria, R.; DeFronzo, R.A.; Cusi, K. Dose-response effect of elevated plasma free fatty acid on insulin signaling. *Diabetes* **2005**, *54*, 1640-1648.
203. DeFronzo, R.A.; Tobin, J.D.; Andres, R. Glucose clamp technique: A method for quantifying insulin secretion and resistance. *Am J Physiol Gastroint Liver Physiol* **1979**, *237*, G214-G223.
204. Katz, A.; Nambi, S.S.; Mather, K.; Baron, A.D.; Follmann, D.A.; Sullivan, G.; Quon, M.J. Quantitative insulin sensitivity check index: A simple, accurate method for assessing insulin sensitivity in humans. *J Clin Endocrinol Metab* **2000**, *85*, 2402-2410.

205. García-Fuentes, E.; Garrido-Sánchez, L.; Tinahones, F.J. Homeostatic model assessment (homa). Aplicaciones prácticas. *Aplicaciones Prácticas ARIO* **2008**, *24*, 291.
206. Matthews, D.R.; Hosker, J.P.; Rudenski, A.S.; Naylor, B.A.; Treacher, D.F.; Turner, R.C. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia* **1985**, *28*, 412-419.
207. Bonora, E.; Targher, G.; Alberiche, M.; Bonadonna, R.C.; Saggiani, F.; Zenere, M.B.; Monauni, T.; Muggeo, M. Homeostasis model assessment closely mirrors the glucose clamp technique in the assessment of insulin sensitivity: Studies in subjects with various degrees of glucose tolerance and insulin sensitivity. *Diabetes care* **2000**, *23*, 57-63.
208. Guerrero-Romero, F.; Simental-Mendía, L.E.; González-Ortiz, M.; Martínez-Abundis, E.; Ramos-Zavala, M.G.; Hernández-González, S.O.; Jacques-Camarena, O.; Rodríguez-Morán, M. The product of triglycerides and glucose, a simple measure of insulin sensitivity. Comparison with the euglycemic-hyperinsulinemic clamp. *J Clin Endocrinol Metab* **2010**, *95*, 3347-3351.
209. González-Torres, L.; Matos, C.; Vázquez-Velasco, M.; Santos-López, J.A.; Sánchez-Martínez, I.; García-Fernández, C.; Bastida, S.; Benedí, J.; Sánchez-Muniz, F.J. Glucomannan-and glucomannan plus spirulina-enriched pork affect liver fatty acid profile, ldl receptor expression and antioxidant status in Zucker fa/fa rats fed atherogenic diets. *Food Nutr Res* **2017**, *61*, 1-14.
210. Sánchez-Pozo, A. In *Alteraciones de la digestión y absorción intestinal de los lípidos y del metabolismo de las lipoproteínas*, Bioquímica clínica, 2002; McGraw-Hill Interamericana de España: pp 161-172.
211. Vázquez-Velasco, M. Efectos del surimi de calamar enriquecido con glucomanano y espirulina sobre marcadores del síndrome metabólico en ratas Zucker fa-fa. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2016.
212. Lee, J.Y.; Ye, J.; Gao, Z.; Youn, H.S.; Lee, W.H.; Zhao, L.; Sizemore, N.; Hwang, D.H. Reciprocal modulation of toll-like receptor-4 signaling pathways involving MyD88 and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt by saturated and polyunsaturated fatty acids. *J Biol Chem* **2003**, *278*, 37041-37051.
213. Matsuura, E.; Kobayashi, K.; Tabuchi, M.; Lopez, L.R. Oxidative modification of low-density lipoprotein and immune regulation of atherosclerosis. *Progress in lipid research* **2006**, *45*, 466-486.

214. Hayden, J.M.; Brachova, L.; Higgins, K.; Obermiller, L.; Sevanian, A.; Khandrika, S.; Reaven, P.D. Induction of monocyte differentiation and foam cell formation in vitro by 7-ketocholesterol. *Journal of lipid research* **2002**, *43*, 26-35.
215. Sánchez-Muniz, F.J.; Bocanegra, A.; Benedí, J.; Bastida, S. *Algae and cardiovascular health*. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition: 2013.
216. Carmena, R. Dyslipidemia in type 2 diabetes mellitus. In serrano-ríos, j. A. (ed.). Type 2 diabetes mellitus. Barcelona, Spain. Elsevier sl. **2010**, 219-230.
217. Ordovás, J.M. Gene-environment interactions predisposing to type 2 diabetes mellitus. In serrano-ríos, j. A. (ed.), type 2 diabetes mellitus. Barcelona, Spain. Elsevier sl. **2010**, 79-87.
218. Ordovas, J.M.; Shen, J. Gene-environment interactions and susceptibility to metabolic syndrome and other chronic diseases. *J Periodontol* **2008**, *79*, 1508-1513.
219. Sánchez-Muniz, F.J.; Bastida, S. Do not use the friedewald formula to calculate ldl-cholesterol in hypercholesterolaemic rats. *Eur J Lipid Sci Technol* **2008**, *110*, 295-301.
220. Ho, Y.K.; Smith, R.G.; Brown, M.S.; Goldstein, J.L. Low-density lipoprotein (ldl) receptor activity in human acute myelogenous leukemia cells. *Blood* **1978**, *52*, 1099-1114.
221. Dolphin, P.J. Serum and hepatic nascent lipoproteins in normal and hypercholesterolemic rats. *J Lipid Res* **1981**, *22*, 971-989.
222. Kissebah, A.H.; Alfarsi, S.; Evans, D.J. Low density lipoprotein metabolism in familial combined hyperlipidemia. Mechanism of the multiple lipoprotein phenotypic expression. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* **1984**, *4*, 614-624.
223. Guo, L.S.; Hamilton, R.L.; Kane, J.P.; Fielding, C.J.; Chen, G.C. Characterization and quantitation of apolipoproteins ai and e of normal and cholesterol-fed guinea pigs. *J Lipid Res* **1982**, *23*, 531-542.
224. Guo, L.S.; Hamilton, R.L.; Ostwald, R.; Havel, R.J. Secretion of nascent lipoproteins and apolipoproteins by perfused livers of normal and cholesterol-fed guinea pigs. *J Lipid Res* **1982**, *23*, 543-555.
225. González-Torres, L.; Vázquez-Velasco, M.; Olivero-David, R.; Bastida, S.; Benedí, J.; González, R.R.; González-Muñoz, M.J.; Sánchez-Muniz, F.J. Glucomannan and glucomannan plus spirulina added to pork significantly block dietary cholesterol effects on lipoproteinemia, arylesterase activity, and cyp7a1 expression in zucker fa/fa rats. *J Physiol Biochem* **2015**, *71*, 773-784.

226. Olivero-David, R.; Schultz-Moreira, A.; Vázquez-Velasco, M.; González-Torres, L.; Bastida, S.; Benedí, J.; Sanchez-Reus, M.I.; González-Muñoz, M.J.; Sánchez-Muniz, F.J. Effects of nori-and wakame-enriched meats with or without supplementary cholesterol on arylesterase activity, lipaemia and lipoproteinaemia in growing wistar rats. *Br J Nutr* **2011**, *106*, 1476-1486.
227. Schultz, A.R.; Olivero-David, R.; Vázquez-Velasco, M.; González-Torres, L.; Benedí, J.; Bastida, S.; Sánchez-Muniz, F.J. Protective effects of sea spaghetti-enriched restructured pork against dietary cholesterol: Effects on arylesterase and lipoprotein profile and composition of growing rats. *J Med Food* **2014**, *17*, 921-928.
228. Vázquez-Velasco, M.; González-Torres, L.; Olivero-David, R.; Bastida, S.; Benedí, J.; Sánchez-Reus, M.I.; González-Muñoz, M.J.; Sánchez-Muniz, F.J. Lipoproteinemia and arylesterase activity in Zucker fa/fa rats fed glucomannan/spirulina-enriched squid-surimi. *Eur J Lipid Sci Technol* **2013**, *115*, 1274-1283.
229. García-Quismondo Fernández, A. Proteína c reactiva, índice de conicidad y factores de riesgo cardiovascular en pacientes con diabetes tipo 2. Tesis Doctoral, Universidad Complutense de Madrid, 2016.
230. Viejo, J.; Bastida, S.; Sánchez-Muniz, F.J.; García-Linares, M.C.; García-Arias, M.T. Effect of olive oil-fried sardine consumption on liver lipid composition and fatty acid cholesterol esterification in hypercholesterolemic rats. *Food Sci Technol Int* **2003**, *9*, 329-338.
231. Cuesta, C.; Sánchez-Muniz, F.J.; García-La Cuesta, A.; Garrido, R.; Castro, A.; San-Felix, B.; Domingo, A. Effects of age and cigarette smoking on serum concentrations of lipids and apolipoproteins in a male military population. *Atherosclerosis* **1989**, *80*, 33-39.
232. Angulo, P.; Lindor, K.D. Insulin resistance and mitochondrial abnormalities in NASH: A cool look into a burning issue. *Gastroenterology* **2001**, *120*, 1281-1285.
233. Iantomasi, T.; Favilli, F.; Marraccini, P.; Stio, M.; Treves, C.; Quatrone, A.; Capaccioli, S.; Vincenzini, M.T. Age and GSH metabolism in rat cerebral cortex, as related to oxidative and energy parameters. *Mech Ageing Develop* **1993**, *70*, 65-82.
234. Ungvari, Z.; Bailey-Downs, L.; Gautam, T.; Sosnowska, D.; Wang, M.; Monticone, R.E.; Telljohann, R.; Pinto, J.T.; De Cabo, R.; Sonntag, W.E. Age-associated vascular oxidative stress, Nrf2 dysfunction, and NF-κB activation in the nonhuman primate macaca mulatta. *J Gerontol Series A: Biol Sci Med Sci* **2011**, *66*, 866-875.

BIBLIOGRAFÍA

235. Narimiya, M.; Azhar, S.; Dolkas, C.B.; Mondon, C.E.; Sims, C.; Wright, D.W.; Reaven, G.M. Insulin resistance in older rats. *Am J Physiol Endocrinol Met* **1984**, *246*, E397-E404.
236. Kalén, A.; Appelkvist, E.L.; Dallner, G. Age-related changes in the lipid compositions of rat and human tissues. *Lipids* **1989**, *24*, 579-584.
237. Dey, A.; Lakshmanan, J. The role of antioxidants and other agents in alleviating hyperglycemia mediated oxidative stress and injury in liver. *Food Funct* **2013**, *4*, 1148-1184.
238. Ramakrishna, V.; Jailkhani, R. Oxidative stress in non-insulin-dependent diabetes mellitus (niddm) patients. *Acta diabetologica* **2008**, *45*, 41-46.
239. King, G.L.; Loeken, M.R. Hyperglycemia-induced oxidative stress in diabetic complications. *Histochem Cell Biol* **2004**, *122*, 333-338.
240. Martínez-Cayuela, M. *Estrés oxidativo y mecanismos de defensa antioxidante. En: Tratado de nutrición. Bases fisiológicas y bioquímicas de la nutrición*. Ed. Médica Panamericana: Madrid, España, 2010; Vol. 1.
241. Borg, D.C. Oxygen free radicals and tissue injury. In *Oxygen free radicals in tissue damage*, Springer: 1993; pp 12-53.
242. Cadet, J.; Brannock, C. Invited review free radicals and the pathobiology of brain dopamine systems. *Neurochem Int* **1998**, *32*, 117-131.
243. Cadet, J.; Douki, T.; Gasparutto, D.; Ravanat, J.L. Oxidative damage to DNA: Formation, measurement and biochemical features. *Mutation Res/Fund Mol Mech Mutagen* **2003**, *531*, 5-23.
244. Halliwell, B. Reactive oxygen species in living systems: Source, biochemistry, and role in human disease. *Am J Med* **1991**, *91*, S14-S22.
245. Apel, K.; Hirt, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol* **2004**, *55*, 373-399.
246. Houstis, N.; Rosen, E.D.; Lander, E.S. Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* **2006**, *440*, 944-948.
247. Cooper, D.; Stokes, K.Y.; Tailor, A.; Granger, D.N. Oxidative stress promotes blood cell-endothelial cell interactions in the microcirculation. *Cardiovasc Toxicol* **2002**, *2*, 165-180.
248. Yuan, Y.V.; Kitts, D.D. Endogenous antioxidants: Role of antioxidant enzymes in biological systems. *Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects, and Applications*, Champaign, Illinois: AOCS Press **1997**, *15*, 258-270.

249. Hopps, E.; Noto, D.; Caimi, G.; Averna, M.R. A novel component of the metabolic syndrome: The oxidative stress. *Nutr Met Cardiovasc Dis* **2010**, *20*, 72-77.
250. Grune, T.; Sommerburg, O.; Siems, W.G. Oxidative stress in anemia. *Clin Nephrol* **2000**, *53*, S18-22.
251. Schultz-Moreira, A. Derivados cárnicos con algas: Implicaciones sobre el metabolismo lipoproteico, estatus antioxidante y protección hepática. *Tesis Doctoral* **2014**.
252. Guan, H.P.; Chen, G. Factors affecting insulin-regulated hepatic gene expression. *Progress in Molecular Biology and Translational Science: Glucose Homeostasis and the Pathogenesis of Diabetes Mellitus* **2013**, *121*, 165-215.
253. Leturque, A.; Brot-Laroche, E.; Le Gall, M. Glut2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. *Am J Physiol Endocrinol Met* **2009**, *296*, E985-E992.
254. Leavens, K.F.; Birnbaum, M.J. Insulin signaling to hepatic lipid metabolism in health and disease. *Critical Rev Biochem Mol Biol* **2011**, *46*, 200-215.
255. Guillou, H.; Martin, P.G.P.; Pineau, T. Transcriptional regulation of hepatic fatty acid metabolism. In *Lipids in health and disease*, Springer: 2008; pp 3-47.
256. Ferre, P.; Foufelle, F. Hepatic steatosis: A role for de novo lipogenesis and the transcription factor srebp-1c. *Diabetes Obesity Metab* **2010**, *12*, 83-92.
257. Samuel, V.T.; Liu, Z.X.; Qu, X.; Elder, B.D.; Bilz, S.; Befroy, D.; Romanelli, A.J.; Shulman, G.I. Mechanism of hepatic insulin resistance in non-alcoholic fatty liver disease. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 32345-32353.
258. Feige, J.N.; Gelman, L.; Michalik, L.; Desvergne, B.; Wahli, W. From molecular action to physiological outputs: Peroxisome proliferator-activated receptors are nuclear receptors at the crossroads of key cellular functions. *Prog Lipid Res* **2006**, *45*, 120-159.
259. Desvergne, B.; Feige, J.N.; Casals-Casas, C. Ppar-mediated activity of phthalates: A link to the obesity epidemic? *Mol Cell Endocrinol* **2009**, *304*, 43-48.
260. Viollet, B.; Lantier, L.; Devin-Leclerc, J.; Hébrard, S.; Amouyal, C.; Mounier, R.; Foretz, M.; Andreelli, F. Targeting the ampk pathway for the treatment of type 2 diabetes. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)* **2009**, *14*, 3380.
261. Brown, M.S.; Goldstein, J.L. The srebp pathway: Regulation of cholesterol metabolism by proteolysis of a membrane-bound transcription factor. *Cell* **1997**, *89*, 331-340.

262. Farese, R.V.; Zechner, R.; Newgard, C.B.; Walther, T.C. The problem of establishing relationships between hepatic steatosis and hepatic insulin resistance. *Cell Metab* **2012**, *15*, 570-573.
263. Farese, R.V.; Sajan, M.P. Metabolic functions of atypical protein kinase c: “Good” and “bad” as defined by nutritional status. *Am J Physiol Endocrinol Met* **2010**, *298*, E385-E394.
264. Asrih, M.; Jornayvaz, F.R. Metabolic syndrome and nonalcoholic fatty liver disease: Is insulin resistance the link? *Mol Cell Endocrinol* **2015**, *418*, 55-65.
265. Perito, E.R.; Rodriguez, L.A.; Lustig, R.H. Dietary treatment of nonalcoholic steatohepatitis. *Current opinion in gastroenterology* **2013**, *29*, 170-176.
266. Chalasani, N.; Younossi, Z.; Lavine, J.E.; Diehl, A.M.; Brunt, E.M.; Cusi, K.; Charlton, M.; Sanyal, A.J. The diagnosis and management of non-alcoholic fatty liver disease: Practice guideline by the american association for the study of liver diseases, american college of gastroenterology, and the american gastroenterological association. *Hepatology* **2012**, *55*, 2005-2023.
267. Than, N.N.; Newsome, P.N. A concise review of non-alcoholic fatty liver disease. *Atherosclerosis* **2015**, *239*, 192-202.
268. Ahmed, M.H.; Barakat, S.; Almobarak, A.O. Nonalcoholic fatty liver disease and cardiovascular disease: Has the time come for cardiologists to be hepatologists? *J Obesity* **2012**, *2012*.
269. Brea, A.; Puzo, J. Non-alcoholic fatty liver disease and cardiovascular risk. *Int J Cardiol* **2013**, *167*, 1109-1117.
270. Lonardo, A.; Ballestri, S.; Marchesini, G.; Angulo, P.; Loria, P. Nonalcoholic fatty liver disease: A precursor of the metabolic syndrome. *Digestive and Liver Disease* **2015**, *47*, 181-190.
271. Angulo, P. Long-term mortality in nonalcoholic fatty liver disease: Is liver histology of any prognostic significance? *Hepatology* **2010**, *51*, 373-375.
272. Angulo, P. Corrections: Long-term mortality in nonalcoholic fatty liver disease: Is liver histology of any prognostic significance? *Hepatology* **2010**, *51*, 1868-1868.
273. Stanković, M.N.; Mladenović, D.R.; Đuričić, I.; Šobajić, S.S.; Timić, J.; Jorgačević, B.; Aleksić, V.; Vučević, D.B.; Ješić-Vukićević, R.; Radosavljević, T.S. Time-dependent changes and association between liver free fatty acids, serum lipid profile and histological features in mice model of nonalcoholic fatty liver disease. *Archives Med Res* **2014**, *45*, 116-124.

274. Day, C.P.; James, O.F.W. Steatohepatitis: A tale of two "hits"? Elsevier: 1998.
275. Alkhoury, N.; Dixon, L.J.; Feldstein, A.E. Lipotoxicity in nonalcoholic fatty liver disease: Not all lipids are created equal. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol* **2009**, *3*, 445-451.
276. Babio, N.; Sorli, M.; Bullo, M.; Basora, J.; Ibarrola-Jurado, N.; Fernandez-Ballart, J.; Martinez-Gonzalez, M.A.; Serra-Majem, L.; Gonzalez-Perez, R.; Salas-Salvado, J., *et al.* Association between red meat consumption and metabolic syndrome in a mediterranean population at high cardiovascular risk: Cross-sectional and 1-year follow-up assessment. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* **2012**, *22*, 200-207.
277. Boada, L.D.; Henríquez-Hernández, L.A.; Luzardo, O.P. The impact of red and processed meat consumption on cancer and other health outcomes: Epidemiological evidences. *Food Chem Toxicol* **2016**, *92*, 236-244.
278. Reifen, R.; Karlinsky, A.; Stark, A.H.; Berkovich, Z.; Nyska, A. Alpha-linolenic acid (ala) is an anti-inflammatory agent in inflammatory bowel disease. *J Nutr Biochem* **2015**, *26*, 1632-1640.
279. Serra, L.L.; Aranceta, J. Objetivos nutricionales para la población española. Consenso de la sociedad española de nutrición comunitaria. *Guías Alimentarias para la Población Española. Madrid, SENC* **2001**, 345-351.
280. Garcimartin, A.; Merino, J.J.; Santos-Lopez, J.A.; Lopez-Oliva, M.E.; Gonzalez, M.P.; Sanchez-Muniz, F.J.; Benedi, J. Silicon as neuroprotector or neurotoxic in the human neuroblastoma sh-sy5y cell line. *Chemosphere* **2015**, *135*, 217-224.
281. Serrano, A.; Cofrades, S.; Jiménez-Colmenero, F. Characteristics of restructured beef steak with different proportions of walnut during frozen storage. *Meat Sci* **2006**, *72*, 108-115.
282. Reeves, P.G.; Nielsen, F.H.; Fahey Jr, G.C. Ain-93 purified diets for laboratory rodents: Final report of the american institute of nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the ain-76a rodent diet. *J Nutr* **1993**, *123*, 1939-1951.
283. Schultz, A.; González-Torres, L.; Olivero-David, R.; Bastida, S.; Benedí, J.; Sánchez-Muniz, F.J. Wakame and nori in restructured meats included in cholesterol-enriched diets affect the antioxidant enzyme gene expressions and activities in wistar rats. *Plant Foods Hum Nutr* **2010**, *65*, 290-298.
284. Folch, J.; Lees, M.; Sloane-Stanley, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem* **1957**, *226*, 497-509.

285. Olivero-David, R.J. Digestibilidad de los compuestos termooxidados y su influencia sobre la defensa antioxidante intestinal en rata. Efectos del ayuno y grado de alteración del aceite de fritura. **2010**.
286. Bradford, M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **1976**, 72, 248-254.
287. Durrington, P.N.; Mackness, B.; Mackness, M.I. Paraoxonase and atherosclerosis. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* **2001**, 21, 473-480.
288. Aviram, M.; Rosenblat, M.; Bisgaier, C.L.; Newton, R.S.; Primo-Parmo, S.L.; La Du, B.N. Paraoxonase inhibits high-density lipoprotein oxidation and preserves its functions. A possible peroxidative role for paraoxonase. *J Clin Invest* **1998**, 101, 1581.
289. Nus, M.; Sánchez-Muniz, F.J.; Sánchez-Montero, J.M. In *Arilesterasa. Aspectos metodológicos y funcionales de una enzima clave en la enfermedad cardiovascular. Parte i*, Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2008a.
290. Nus, M.; Sánchez-Muniz, F.J.; Sánchez-Montero, J.M. In *Arilesterasa. Aspectos metodológicos y funcionales de una enzima clave en la enfermedad cardiovascular. Parte ii*, Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2008b.
291. Terpstra, A.H.M.; Sanchez-Muniz, F.J.; West, C.E.; Woodward, C.J.H. The density profile and cholesterol concentration of serum lipoproteins in domestic and laboratory animals. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* **1982**, 71, 669-673.
292. Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol* **1984**, 105, 121-126.
293. Neha, J.M.R.; Mishra, R. Antioxidant activity of trikatu megaext. *Inter J Res Pharm Biomed Sci* **2011**, 2, 624-628.
294. Hissin, P.J.; Hilf, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Anal Biochem* **1976**, 74, 214-226.
295. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative pcr and the 2- $\delta\delta$ ct method. *Methods* **2001**, 25, 402-408.
296. Rath, M.M.; Panigrahi, M.K.; Pattnaik, K.; Bhuyan, P.; Kar, S.K.; Misra, B.; Misra, D.; Meher, C.; Agrawal, O.; Rath, J. Histological evaluation of non-alcoholic fatty liver disease and its correlation with different noninvasive scoring systems with special reference to fibrosis: A single center experience. *J Clinical Exp Hepatol* **2016**.

297. Kleiner, D.E.; Brunt, E.M.; Van-Natta, M.; Behling, C.; Contos, M.J.; Cummings, O.W.; Ferrell, L.D.; Liu, Y.C.; Torbenson, M.S.; Unalp-Arida, A. Design and validation of a histological scoring system for nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology* **2005**, *41*, 1313-1321.
298. FAO. Food outlook. Global market analysis. *Food and Agriculture Organization of the United Nations* **2011**.
299. Bouvard, V.; Loomis, D.; Guyton, K.Z.; Grosse, Y.; El Ghissassi, F.; Benbrahim-Tallaa, L.; Guha, N.; Mattock, H.; Straif, K. Carcinogenicity of consumption of red and processed meat. *Lancet Oncology* **2015**, *16*, 1599.
300. Hill, A.B. The environment and disease: Association or causation? SAGE Publications: 1965.
301. Canales, A.; Benedí, J.; Nus, M.; Librelotto, J.; Sánchez-Montero, J.M.; Sánchez-Muniz, F.J. Effect of walnut-enriched restructured meat in the antioxidant status of overweight/obese senior subjects with at least one extra chd-risk factor. *J Am Coll Nutr* **2007**, *26*, 225-232.
302. Zelber-Sagi, S.; Nitzan-Kaluski, D.; Goldsmith, R.; Webb, M.; Blendis, L.; Halpern, Z.; Oren, R. Long term nutritional intake and the risk for non-alcoholic fatty liver disease (nafld): A population based study. *Journal of hepatology* **2007**, *47*, 711-717.
303. Zelber-Sagi, S.; Nitzan-Kaluski, D.; Halpern, Z.; Oren, R. Prevalence of primary non-alcoholic fatty liver disease in a population-based study and its association with biochemical and anthropometric measures. *Liver International* **2006**, *26*, 856-863.
304. Nestic, D.M.; Stevanovic, D.M.; Stankovic, S.D.; Milosevic, V.L.; Trajkovic, V.; Starcevic, V.P.; Severs, W.B. Age-dependent modulation of central ghrelin effects on food intake and lipid metabolism in rats. *Eur J Pharmacol* **2013**, *710*, 85-91.
305. Schultz, A.; Benedí, J.; González-Torres, L.; Olivero-David, R.; Bastida, S.; Sánchez-Reus, M.I.; González-Muñoz, M.J.; Sánchez-Muniz, F.J. Effects of diet enriched with restructured meats, containing himanthalia elongata, on hypercholesterolaemic induction, cyp7a1 expression and antioxidant enzyme activity and expression in growing rats. *Food Chem* **2011**, *129*, 1623-1630.
306. Choi, S.J.; Decker, E.A.; McClements, D.J. Impact of iron encapsulation within the interior aqueous phase of water-in-oil-in-water emulsions on lipid oxidation. *Food Chemistry* **2009**, *116*, 271-276.

307. Hemar, Y.; Cheng, L.J.; Oliver, C.M.; Sanguansri, L.; Augustin, M. Encapsulation of resveratrol using water-in-oil-in-water double emulsions. *Food Biophysics* **2010**, *5*, 120-127.
308. O'Regan, J.; Mulvihill, D.M. Water soluble inner aqueous phase markers as indicators of the encapsulation properties of water-in-oil-in-water emulsions stabilized with sodium caseinate. *Food Hydrocolloids* **2009**, *23*, 2339-2345.
309. Surh, J. Influence of pH, emulsifier concentration, and homogenization condition on the production of stable oil-in-water emulsion droplets coated with fish gelatin. *Food Science and Biotechnology* **2007**, *16*, 999-1005.
310. Carrillo-Navas, H.; Cruz-Olivares, J.; Varela-Guerrero, V.; Alamilla-Beltrán, L.; Vernon-Carter, E.J.; Pérez-Alonso, C. Rheological properties of a double emulsion nutraceutical system incorporating chia essential oil and ascorbic acid stabilized by carbohydrate polymer-protein blends. *Carbohydrate Polymers* **2012**, *87*, 1231-1235.
311. Fechner, A.; Knoth, A.; Scherze, I.; Muschiolik, G. Stability and release properties of double-emulsions stabilised by caseinate-dextran conjugates. *Food Hydrocolloids* **2007**, *21*, 943-952.
312. Oszmiański, J.; Wojdyło, A. Comparative study of phenolic content and antioxidant activity of strawberry puree, clear, and cloudy juices. *European Food Research and Technology* **2009**, *228*, 623-631.
313. Ixtaina, V.Y.; Martínez, M.L.; Spotorno, V.; Mateo, C.M.; Maestri, D.M.; Diehl, B.W.K.; Nolasco, S.M.; Tomás, M.C. Characterization of chia seed oils obtained by pressing and solvent extraction. *Journal of Food Composition and Analysis* **2011**, *24*, 166-174.
314. Moon, J.K.; Shibamoto, T. Antioxidant assays for plant and food components. *Journal of agricultural and food chemistry* **2009**, *57*, 1655-1666.
315. McClements, D.J.; Decker, E.A. Lipid oxidation in oil-in-water emulsions: Impact of molecular environment on chemical reactions in heterogeneous food systems. *Journal of Food Science* **2000**, *65*, 1270-1282.
316. Medina, I.; Lois, S.; Alcántara, D.; Lucas, R.; Morales, J.C. Effect of lipophilization of hydroxytyrosol on its antioxidant activity in fish oils and fish oil-in-water emulsions. *Journal of agricultural and food chemistry* **2009**, *57*, 9773-9779.

317. Poyato, C.; Navarro-Blasco, I.; Calvo, M.I.; Cavero, R.Y.; Astiasarán, I.; Ansorena, D. Oxidative stability of o/w and w/o/w emulsions: Effect of lipid composition and antioxidant polarity. *Food Research International* **2013**, *51*, 132-140.
318. Dwyer, S.P.O.; O'Beirne, D.; Ní Eidhin, D.; O'Kennedy, B.T. Effects of green tea extract and α -tocopherol on the lipid oxidation rate of omega-3 oils, incorporated into table spreads, prepared using multiple emulsion technology. *Journal of food science* **2012**, *77*, N58-N65.
319. Matalanis, A.; Decker, E.A.; McClements, D.J. Inhibition of lipid oxidation by encapsulation of emulsion droplets within hydrogel microspheres. *Food Chemistry* **2012**, *132*, 766-772.
320. Jacobsen, C.; Let, M.B.; Nielsen, N.S.; Meyer, A.S. Antioxidant strategies for preventing oxidative flavour deterioration of foods enriched with n-3 polyunsaturated lipids: A comparative evaluation. *Trends in Food Science & Technology* **2008**, *19*, 76-93.
321. Min, B.; Nam, K.C.; Cordray, J.; Ahn, D.U. Endogenous factors affecting oxidative stability of beef loin, pork loin, and chicken breast and thigh meats. *Journal of Food Science* **2008**, *73*.
322. Wangcharoen, W.; Morasuk, W. Antioxidant capacity changes of bird chili (*capsicum frutescens* linn) during hot air drying. *Kasetsart Journal (Natural science)* **2009**, *43*, 12-20.
323. Decker, E.A.; Xu, Z. Minimizing rancidity in muscle foods. *Food technology (USA)* **1998**.
324. Librelotto, J.; Bastida, S.; Zulim-Botega, D.; Jiménez-Colmenero, F.; Sánchez-Muniz, F.J. Effect of long frozen storage on the formation of triglyceride alteration compounds of pan-fried functional restructured beef steaks. *Meat science* **2009**, *81*, 726-730.
325. Arihara, K. Strategies for designing novel functional meat products. *Meat Sci* **2006**, *74*, 219-229.
326. Waldman, R.C.; Suess, G.G.; Brungardt, V.H. Fatty acids of certain bovine tissue and their association with growth, carcass and palatability traits. *Journal of Animal Science* **1968**, *27*, 632-635.
327. Lawton, C.L.; Delargy, H.J.; Brockman, J.; Smith, F.C.; Blundell, J.E. The degree of saturation of fatty acids influences post-ingestive satiety. *British Journal of Nutrition* **2000**, *83*, 473-482.
328. Duncan, K.H.; Bacon, J.A.; Weinsier, R.L. The effects of high and low energy density diets on satiety, energy intake, and eating time of obese and nonobese subjects. *The American journal of clinical nutrition* **1983**, *37*, 763-767.

329. Cossio-Bolaños, M.; Gómez Campos, R.; Vargas Vitoria, R.; Fogaça, H.; Tadeu, R.; Arruda, M. Curvas de referencia para valorar el crecimiento físico de ratas machos wistar. *Nutrición Hospitalaria* **2013**, *28*, 2151-2156.
330. Beynen, A.C.; Boogaard, A.; Van Laack, H.L.; Katan, M.B. Cholesterol metabolism in two strains of rats with high or low response of serum cholesterol to a cholesterol-rich diet. *J Nutr* **1984**, *114*, 1640-1651.
331. Chapman, I.M. The anorexia of aging. *Clin Geriatr Med* **2007**, *23*, 735-756.
332. González-Torres, L.; Churrua, I.; Schultz, A.; Bastida, S.; Benedí, J.; Portillo, M.P.; Sánchez-Muniz, F.J. Effects of restructured pork containing himanthalia elongata on adipose tissue lipogenic and lipolytic enzyme expression of normo-and hypercholesterolemic rats. *J Nutrigenetics Nutrigenomics* **2012**, *5*, 158-167.
333. De-las-Heras, M.R.B. In *Papel del tejido adiposo blanco, marrón y perivascular en las complicaciones vasculares asociadas a la obesidad*, Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia, 2016.
334. Oi-Kano, Y.; Kawada, T.; Watanabe, T.; Koyama, F.; Watanabe, K.; Senbongi, R.; Iwai, K. Extra virgin olive oil increases uncoupling protein 1 content in brown adipose tissue and enhances noradrenaline and adrenaline secretions in rats. *The Journal of nutritional biochemistry* **2007**, *18*, 685-692.
335. D'Aquino, M.; Benedetti, P.C.; Felice, M.D.; Gentili, V.; Tomassi, G.; Maiorino, M.; Ursini, F. Effect of fish oil and coconut oil on antioxidant defence system and lipid peroxidation in rat liver. *Free Radical Res Com* **1991**, *12*, 147-152.
336. Christon, R.; Haloui, R.B.; Durand, G. Dietary polyunsaturated fatty acids and aging modulate glutathione-related antioxidants in rat liver. *J Nutr* **1995**, *125*, 3062.
337. Vázquez-Velasco, M.; González-Torres, L.; López-Gasco, P.; Bastida, S.; Benedí, J.; Sánchez-Reus, M.I.; González-Muñoz, M.J.; Sánchez-Muniz, F.J. Liver oxidation and inflammation in fa/fa rats fed glucomannan/spirulina-surimi. *Food Chem* **2014**, *159*, 215-221.
338. Bocanegra, A.; Benedí, J.; Sánchez-Muniz, F.J. Differential effects of konbu and nori seaweed dietary supplementation on liver glutathione status in normo-and hypercholesterolaemic growing rats. *Brit J Nutr* **2006**, *95*, 696-702.
339. Vidé, J.; Virsolvy, A.; Romain, C.; Ramos, J.; Jouy, N.; Richard, S.; Cristol, J.P.; Gaillet, S.; Rouanet, J.M. Dietary silicon-enriched spirulina improves early atherosclerosis markers in hamsters on a high-fat diet. *Nutrition* **2015**, *31*, 1148-1154.

340. Garcimartín, A.; Merino, J.J.; González, M.P.; Sánchez-Reus, M.I.; Sánchez-Muniz, F.J.; Bastida, S.; Benedí, J. Organic silicon protects human neuroblastoma sh-sy5y cells against hydrogen peroxide effects. *BMC Complement Altern Med* **2014**, *14*, 384.
341. Manna, C.; Galletti, P.; Cucciolla, V.; Montedoro, G.; Zappia, V. Olive oil hydroxytyrosol protects human erythrocytes against oxidative damages. *J Nutr Biochem* **1999**, *10*, 159-165.
342. Serhan, C.N.; Arita, M.; Hong, S.; Gotlinger, K. Resolvins, docosatrienes, and neuroprotectins, novel omega-3-derived mediators, and their endogenous aspirin-triggered epimers. *Lipids* **2004**, *39*, 1125-1132.
343. An, W.S.; Kim, H.J.; Cho, K.H.; Vaziri, N.D. Omega-3 fatty acid supplementation attenuates oxidative stress, inflammation, and tubulointerstitial fibrosis in the remnant kidney. *American Journal of Physiology-Renal Physiology* **2009**, *297*, F895-F903.
344. Suh, J.H.; Shenvi, S.V.; Dixon, B.M.; Liu, H.; Jaiswal, A.K.; Liu, R.M.; Hagen, T.M. Decline in transcriptional activity of nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proce Natl Acad Sci USA* **2004**, *101*, 3381-3386.
345. Tomobe, K.; Shinozuka, T.; Kuroiwa, M.; Nomura, Y. Age-related changes of nrf2 and phosphorylated gsk-3 β in a mouse model of accelerated aging (somp8). *Arch Gerontol Geriatr* **2012**, *54*, e1-e7.
346. Yates, M.S.; Tran, Q.T.; Dolan, P.M.; Osburn, W.O.; Shin, S.; McCulloch, C.C.; Silkworth, J.B.; Taguchi, K.; Yamamoto, M.; Williams, C.R. Genetic versus chemoprotective activation of nrf2 signaling: Overlapping yet distinct gene expression profiles between keap1 knockout and triterpenoid-treated mice. *Carcinogenesis* **2009**, *30*, 1024-1031.
347. Chambel, S.S.; Santos-Gonçalves, A.; Duarte, T.L. The dual role of nrf2 in nonalcoholic fatty liver disease: Regulation of antioxidant defenses and hepatic lipid metabolism. *BioMed Res Int* **2015**, *2015*.
348. Okada, K.; Warabi, E.i.; Sugimoto, H.; Horie, M.; Tokushige, K.; Ueda, T.; Harada, N.; Taguchi, K.; Hashimoto, E.; Itoh, K. Nrf2 inhibits hepatic iron accumulation and counteracts oxidative stress-induced liver injury in nutritional steatohepatitis. *J Gastroenterol* **2012**, *47*, 924-935.
349. Erdinçler, D.S.; Seven, A.; Inci, F.; Beğler, T.; Candan, G. Lipid peroxidation and antioxidant status in experimental animals: Effects of aging and hypercholesterolemic diet. *Clinica chimica acta* **1997**, *265*, 77-84.

350. Uchida, K.; Nomura, Y.; Kadowaki, M.; Takase, H.; Takano, K.; Takeuchi, N. Age-related changes in cholesterol and bile acid metabolism in rats. *J Lipid Res* **1978**, *19*, 544-552.
351. Bilheimer, D.W.; Eisenberg, S.; Levy, R.I. The metabolism of very low density lipoprotein proteins i. Preliminary in vitro and in vivo observations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism* **1972**, *260*, 212-221.
352. Fidge, N.; Poulis, P. Studies on the metabolism of rat serum very low density apolipoprotein. *Journal of lipid research* **1975**, *16*, 367-378.
353. Pallottini, V.; Martini, C.; Cavallini, G.; Donati, A.; Bergamini, E.; Notarnicola, M.; Caruso, M.G.; Trentalance, A. Modified hmg-coa reductase and ldlr regulation is deeply involved in age-related hypercholesterolemia. *J Cell Biochem* **2006**, *98*, 1044-1053.
354. Zhou, H.; Li, Z.; Silver, D.L.; Jiang, X.C. Cholesteryl ester transfer protein (cetp) expression enhances hdl cholesteryl ester liver delivery, which is independent of scavenger receptor bi, ldl receptor related protein and possibly ldl receptor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids* **2006**, *1761*, 1482-1488.
355. De Souza Ferreira, C.; De Sousa Fomes, L.F.; Santo da Silva, G.E.; Rosa, G. Effect of chia seed (*salvia hispanica* L.) consumption on cardiovascular risk factors in humans: A systematic review. *Nutr Hosp* **2015**, *32*, 1909-1918.
356. Olmedilla-Alonso, B.; Granado-Lorencio, F.; Herrero-Barbudo, C.; Blanco-Navarro, I.; Blázquez-García, S.; Pérez-Sacristán, B. Consumption of restructured meat products with added walnuts has a cholesterol-lowering effect in subjects at high cardiovascular risk: A randomised, crossover, placebo-controlled study. *J Am Coll Nutr* **2008**, *27*, 342-348.
357. Fki, I.; Sahnoun, Z.; Sayadi, S. Hypocholesterolemic effects of phenolic extracts and purified hydroxytyrosol recovered from olive mill wastewater in rats fed a cholesterol-rich diet. *J Agric Food Chem* **2007**, *55*, 624-631.
358. Sánchez-Muniz, F.J.; Cava, F.; Viejo, J.M.; Higón, E.; Cuesta, C. Olive oil-and sunflower oil-fried sardines in the prevention of rat hypercholesterolemia. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft* **1995**, *34*, 16-21.
359. Bocanegra, A.; Bastida, S.; Benedí, J.; Nus, M.; Sánchez-Montero, J.M.; Sánchez-Muniz, F.J. Effect of seaweed and cholesterol-enriched diets on postprandial lipoproteinaemia in rats. *Br J Nutr* **2009**, *102*, 1728-1739.

360. Sánchez-Muniz, F.J.; García-Linares, M.C.; García-Arias, M.T.; Bastida, S.; Viejo, J. Fat and protein from olive oil-fried sardines interact to normalize serum lipoproteins and reduce liver lipids in hypercholesterolemic rats. *J Nutr* **2003**, *133*, 2302-2308.
361. da-Silva, B.P.; Dias, D.M.; de Castro-Moreira, M.E.; Toledo, R.C.L.; da Matta, S.L.P.; Della-Lucia, C.M.; Martino, H.S.D.; Pinheiro-Sant'Ana, H.M. Chia seed shows good protein quality, hypoglycemic effect and improves the lipid profile and liver and intestinal morphology of wistar rats. *Plant Foods for Human Nutrition* **2016**, *71*, 225-230.
362. Ayerza, R.; Coates, W. Ground chia seed and chia oil effects on plasma lipids and fatty acids in the rat. *Nutrition Research* **2005**, *25*, 995-1003.
363. Dietschy, J.M. Dietary fatty acids and the regulation of plasma low density lipoprotein cholesterol concentrations. *Journal of nutrition* **1998**, *128*, 444S-448S.
364. Daumerie, C. M.; Woollett, L.A.; Dietschy, J.M. Fatty acids regulate hepatic low density lipoprotein receptor activity through redistribution of intracellular cholesterol pools. *Proc Natl Acad Sci USA* **1992**, *89*, 10797-10801.
365. Fielding, C.J. Lipoprotein receptors, plasma cholesterol metabolism, and the regulation of cellular free cholesterol concentration. *FASEB J* **1992**, *6*, 3162-3168.
366. Harris, W.S.; Bulchandani, D. Why do omega-3 fatty acids lower serum triglycerides? *Current opinion in lipidology* **2006**, *17*, 387-393.
367. Harris, W.S.; Miller, M.; Tighe, A.P.; Davidson, M.H.; Schaefer, E.J. Omega-3 fatty acids and coronary heart disease risk: Clinical and mechanistic perspectives. *Atherosclerosis* **2008**, *197*, 12-24.
368. Zhiheliu, T.U.; Watanabe, H.; Kato, N. High fat diet enhances colonic cell proliferation and carcinogenesis in rats by elevating serum leptin. *International journal of oncology* **2001**, *19*, 1009-1014.
369. Vázquez-Velasco, M.; González-Torres, L.; Méndez, M.T.; Bastida, S.; Benedí, J.; González-Muñoz, M.J.; Sánchez-Muniz, F.J. Glucomannan and glucomannan plus spirulina-enriched squid-surimi added to high saturated diet affect glycemia, plasma and adipose leptin and adiponectin levels in growing fa/fa rats. *Nutr Hosp* **2015**, *32*, 2718-2724.
370. Sánchez-Muniz, F.J.; Nus, M. In *Importancia de la interacción dieta-genética en la prevención cardiovascular*. En "genética, nutrición y enfermedad", 2008; Edimsa: pp 127-144.

BIBLIOGRAFÍA

- 371. Yamauchi, T.; Kamon, J.; Minokoshi, Y.; Ito, Y.; Waki, H.; Uchida, S.; Yamashita, S.; Noda, M.; Kita, S.; Ueki, K. Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating amp-activated protein kinase. *Nature medicine* **2002**, *8*, 1288-1295.
- 372. Shen, Y.; Song, S.J.; Keum, N.; Park, T. Olive leaf extract attenuates obesity in high-fat diet-fed mice by modulating the expression of molecules involved in adipogenesis and thermogenesis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* **2014**, *2014*.
- 373. Masterton, G.S.; Plevris, J.N.; Hayes, P.C. Review article: Omega-3 fatty acids—a promising novel therapy for non-alcoholic fatty liver disease. *Alimentary pharmacology & therapeutics* **2010**, *31*, 679-692.
- 374. Zhang, T.; Yamashita, Y.; Yasuda, M.; Yamamoto, N.; Ashida, H. Ashitaba (*angelica keiskei*) extract prevents adiposity in high-fat diet-fed c57bl/6 mice. *Food Funct* **2015**, *6*, 134-144.

